

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 特許公報 (B2)

(11)特許番号

特許第3011767号

(P3011767)

(45)発行日 平成12年2月21日(2000.2.21)

(24)登録日 平成11年12月10日(1999.12.10)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 9/50

C 1 2 N 5/06

識別記号

F I

A 6 1 K 9/50

C 1 2 N 5/00

D

E

請求項の数40(全28頁)

(21)出願番号 特願平5-515100

(86) (22)出願日 平成5年3月1日(1993.3.1)

(65)公表番号 特表平7-506961

(43)公表日 平成7年8月3日(1995.8.3)

(86)国際出願番号 PCT/US93/01776

(87)国際公開番号 WO93/16687

(87)国際公開日 平成5年9月2日(1993.9.2)

審査請求日 平成9年4月25日(1997.4.25)

(31)優先権主張番号 843, 485

(32)優先日 平成4年2月28日(1992.2.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 870, 540

(32)優先日 平成4年4月20日(1992.4.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(73)特許権者 99999999

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ テキサス システム  
アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウエスト セプンス ストリート 201

(72)発明者 ハベル, ジエフリー エイ.

アメリカ合衆国 テキサス 78703, オースティン, ビバリーロード 3006

(72)発明者 バタク, チャンドラシカーピー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ  
02154, ウォルサム, スターンズ ヒル  
ロード 3102

(74)代理人 99999999

弁理士 山本 秀策

審査官 星野 紹英

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生物学的材料カプセル化用ゲル

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】生物学的材料をカプセル化、封止、充填、あるいは支持するため、または生体適合性基体を調製するための方法であって、以下の工程：

a) (i) 少なくとも2つのフリーラジカル重合可能置換基を含有する水溶性の生体適合性マクロマー(ここで該マクロマーは無毒性であり、そして分子量が少なくとも400であり、そしてここで該マクロマーは炭水化物、多糖、またはタンパク質を含有する水溶性領域を含まない)；および

(ii) 可視光または長波長の紫外光で活性化されるフリーラジカル開始剤から選択される無毒性フリーラジカル重合開始剤、  
を混合することによってマクロマー混合物を提供する工程；

b) 生物学的材料または基体を該マクロマー混合物でコーティングする工程であって、該生物学的材料が哺乳類細胞、細胞内小器官、細胞内成分、および哺乳類細胞凝集物からなる群から選択され、そして該基体がマイクロカプセル、織込マトリックスおよび補綴の移植片から選択される、工程；および

c) 該コーティングされた生物学的材料またはコーティングされた基体を可視光または長波長の紫外光にさらしてマクロマーの重合を引き起こし、それによって10より大きい重合度を有する重合体ゲルを形成する工程、を包含する方法。

【請求項2】生物学的材料をカプセル化、封止、充填、あるいは支持するため、または生体適合性基体を調製するための方法であって、以下の工程：

a) 生物学的材料または基体を、可視光または長波長の

紫外光で活性化される開始剤、および熱で活性化されるフリーラジカル開始剤からなる群から選択される無毒性フリーラジカル重合開始剤の溶液と接触させて、該生物学的材料または該基体に該開始剤を結合させる工程；

b) 洗浄または希釀により結合していない開始剤を除去する工程；

c) 少なくとも2つのフリーラジカル重合可能置換基を含有する水溶性の無毒性生体適合性マクロマー（少なくとも400の分子量を有する該マクロマー）を、該生物学的材料または基体に添加する工程；および

d) 該開始剤を活性化する試薬に該混合物をさらして、該マクロマーを重合させ、それによって10より大きい重合度を有する重合体ゲルを形成する工程、  
を包含する方法。

【請求項3】前記生物学的材料が、哺乳類細胞、細胞内小器官、細胞内成分および哺乳類細胞凝集物からなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】前記生体適合性基体が、マイクロカプセル、膜、織込マトリックス、多孔性マトリックスおよび補綴の移植片からなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項5】前記フリーラジカル重合可能置換基が、炭素-炭素2重結合または3重結合を有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】無毒性の触媒または促進剤が、前記マクロマー混合物または前記開始剤溶液に添加される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項7】前記水溶性マクロマーが、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（エチルオキサゾリン）、あるいはそれらのブロックまたはランダムコポリマーからなる群から選択され、そしてさらに2つまたはそれより多いフリーラジカル重合可能置換基を含む、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】前記水溶性マクロマーが、ポリ（アミノ酸）、多糖、タンパク質、あるいはそれらのブロックまたはランダムコポリマーからなる群から選択され、そしてさらに2つまたはそれより多いフリーラジカル重合可能置換基を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項9】前記多糖が、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、キトサン、ゲランガム、キサンタンガム、グアーガム、およびK-カラゲナンからなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】前記タンパク質が、ゼラチン、コラーゲンおよびアルブミンからなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項11】前記ゲルが、アクリレート末端ポリ（エチレングリコール）を含むマクロマーから調製される、

請求項1～10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】生物学的に活性な分子をさらに含み、ここで該生物学的に活性な分子が、100個未満のアミノ酸のペプチド、100個以上のアミノ酸のタンパク質、多糖、核酸、有機薬剤、および無機薬剤からなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項13】前記重合開始剤が、エオシン色素、置換基を有するエオシン色素、エオシンY、エチルエオシン、リボフラビン、アセトフェノン、置換基を有するアセトフェノン、フルオレセイン色素、置換基を有するフルオレセイン色素、カンファーキノン、ローズベンガル、メチレングリーン、メチレンブルー、アクリジンオレンジ、エリトロシン、フロキシン、チオニン、キサンチン色素、およびチオキサンチン色素からなる群から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項14】前記触媒または促進剤がアミンである、請求項6に記載の方法。

【請求項15】前記アミンが、トリエタノールアミン、トリエチルアミン、エタノールアミン、N-メチルジエタノールアミン、N,N-ジメチルベンジルアミン、ジベンジルアミン、N-ベンジルエタノールアミン、N-イソプロピルベンジルアミン、テトラメチルエチレンジアミン、リジン、オルニチン、ヒスチジンおよびアルギニンからなる群から選択される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】重合が320nmと800nmの間の波長を有する光で開始される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項17】前記光が514nmまたは365nmの波長を有する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】前記結合していない開始剤が、前記哺乳類細胞または哺乳類細胞凝集物の表面のみで重合が起こるよう、前記マクロマー溶液を用いた希釀によって除去される、請求項3に記載の方法。

【請求項19】前記マクロマー溶液が形状化され、次いで重合される、請求項1に記載の方法。

【請求項20】前記ゲルが支持構造を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項21】カプセル化された生物学的材料または生体適合性基体の周囲に所望の透過性を生じるように、ポリマーが選択され、そして重合が制御される、請求項1に記載の方法。

【請求項22】前記マクロマー溶液の重合が、基体上のコーティングを形成する、請求項1に記載の方法。

【請求項23】光重合可能のポリカチオンが、カプセル化されるべき生物学的材料または基体に予め吸着されて、ゲルの該生物学的材料または基体への付着を増進させる、請求項1に記載の方法。

【請求項24】前記熱で活性化されるフリーラジカル開始剤が、ベンゾイルペルオキシド、過硫化カリウムおよび過硫化アンモニウムから選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項25】前記生物学的材料が、初代または確立系哺乳類細胞株、細胞内小器官、および細胞内非小器官成分から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項26】前記細胞株が、膵臓島細胞、ヒト包皮線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ベータ細胞島細胞腫、リンパ芽球白血病細胞、マウス3T3線維芽細胞、ドーパミン分泌中脳腹側細胞、神經芽細胞様細胞、副腎髓質細胞、およびT細胞から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】前記生物学的材料が、まずマイクロカプセルにカプセル化される、請求項2に記載の方法。

【請求項28】前記マイクロカプセルが、該カプセル化される材料に対して無毒性のイオン凝固性または熱凝固性ポリマーで構成される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】前記マクロマー溶液がさらに、重合速度を加速するための促進剤を含有する、請求項1または2に記載の方法。

【請求項30】前記促進剤が、アリル、ビニルまたはアクリレート基を有する小分子を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】前記促進剤が、N-ビニルピロリジン、2-ビニルピリジン、1-ビニルイミダゾール、9-ビニルカルバゾール、アクリル酸および2-アリル-2-メチル-1,3-シクロヘンタンジオンからなる群から選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】医薬において使用するための、請求項1または2に記載の方法により得られる生物学的材料または生体適合性基体。

【請求項33】糖尿病の処置に使用するための薬物の調製において使用するための、請求項1または2に記載の方法によって得られる生物学的材料または生体適合性基体。

【請求項34】医薬に使用するための、請求項1または2に記載のマクロマー混合物。

【請求項35】生物学的材料が哺乳類組織である、該生物学的材料をカプセル化、封止、充填、あるいは支持するための薬物の構造において使用するための、請求項1、2、5~17、19~21、23、24、および29~31のいずれかに記載のマクロマー混合物。

【請求項36】前記マクロマー溶液の重合が、組織を他の組織または細胞と接着させる、請求項35に記載のマクロマー混合物。

【請求項37】前記マクロマー混合物が、組織内腔に付与され、次いで重合されて該組織内腔の表面上にコーティングまたは支持体を形成する、請求項35に記載のマクロマー混合物。

【請求項38】前記内腔表面での血栓症および炎症反応の予防に使用するための、請求項37に記載のマクロマー混合物。

【請求項39】医薬に使用するための、請求項1または

2に記載の方法により得られる重合体コーティング。

【請求項40】糖尿病の処置のために請求項1または2に記載の生物学的材料または基体をコーティングすることに使用するための薬物の調製において使用するための、請求項39に記載の重合体コーティング。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 発明の分野

本発明は、表面および3次元物体を、水溶性ポリマーの架橋網目構造で、コーティングおよび/またはカプセル化する方法に関する。

マイクロカプセル化技術は、医学の多数の分野に、大きな可能性を有する。例えば、いくつかの重要な用途として、糖尿病の治療のための細胞のカプセル化 (Lim, F., Sun, A. M.、「生体人工的な内分泌性膵臓としてのマイクロカプセル化された膵島」、(1980) Science210、908~910)、赤血球代替物用のヘモグロビンのカプセル化、および薬物の徐放性が挙げられる。しかし、従来法を用いる場合、カプセル化される材料は、しばしば、熱、有機溶媒、および非生理学的pHを含む処理条件に曝されるため、細胞死または細胞の機能低下を起こし、あるいはタンパク質が変性され、その結果として生物学的活性の損失を引き起こし得る。さらに、細胞が、処理条件で生存した場合でも、生体適合性、化学的安定性、免疫防御、および細胞の過増殖に対する抵抗性についての、カプセル化材料への厳密な要求により、従来法の適用可能性は制限される。

例えば、アルギン酸塩（ポリアニオン）と、ポリリジンまたはポリオルニチン（ポリカチオン）とのイオン架橋によるカプセル化法 (Goosenら、(1985) Biotechnology and Bioengineering、27:146) は、比較的穏やかなカプセル化条件を提供する。しかし、このようなイオン的に架橋されたポリマーの長期にわたる機械的および熱的安定性には、疑問が残る。さらに、これらのポリマーは、インビボで移植された場合、細胞の過増殖に対し感受性である (MacMahonら、(1990) J. Nat. Cancer Inst.、82 (22)、1761~1765)。この細胞の過増殖は、時間がたつにつれて、周囲からの栄養素、代謝材料および輸送タンパク質に対するマイクロカプセルの透過性を制限する。このため、カプセル化されたランゲルハンス島は、飢餓して死に至る (O'Shea, G. M. ら、(1986) Diabetes、35:943~946)。

このように、カプセル化ポリマーの特性を制御し、そして透過選択性、化学的安定性、および非常に高い生体適合性の膜を、細胞の存在下で生成する、比較的穏やかな細胞カプセル化法が必要である。生物学的材料と接触する材料のみならず、細胞および組織以外の生物学的材料のカプセル化に対しても、同様の必要性が存在する。

材料が、弱まった特異的な液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘起するか、あるいは材料が所望の機能を果たすことを妨害する非特異的異物応答を誘起せず、そし

てその材料が摂取または移植に際し有毒でない場合は、その材料は生体適合性であると認められる。この材料はまた、血液と接触する場合にも、血栓症のような特異的反応を誘起してならない。

例えば、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート) (ポリ(HEMA))、水不溶性ポリアクリレート、およびアガロースのような水中で膨潤してヒドロゲルを形成するポリマーで製造されたゲルは、脾島および他の動物組織のカプセル化に有用であることが示された (Iwataら、(1989) *Diabetes*, 38:224-225; Lambertiら、(1984) *Appl. Biochem. Biotech.*, 10, 101-105 (1984))。しかし、これらのゲルは、望ましくない機械的特性を有する。アガロースは、弱いゲルを形成し、そしてポリアクリレートは、潜在的な細胞毒性を有する有機溶媒から沈澱させなければならない。Duptaら (1988) は、アクリルアミドを重合してポリアクリルアミドゲルを形成することによる、脾島のマイクロカプセル化を報告している。しかし、この重合プロセスでは、例えば、アクリルアミドおよび架橋剤のような有毒モノマーの存在が必要とされ、そして、速く進行させて完了すると局所的に発熱が起こる。

アルギン酸塩およびポリ(L-リジン)のコアセルベーションにより形成されるマイクロカプセルは、例えば、O'Sheaら、1986に記載のように、免疫防御性であることが示されている。しかし、これらのマイクロカプセルでは、移植後に強度の纖維性の過増殖が観察された (McMahonら、1990; O'Sheaら、1986)。生体適合性を向上させるポリ(エチレンオキシド) (PEO) の使用は、文献中に十分に記載されている。アルギン-ポリ(L-リジン)マイクロカプセルの生体適合性は、PLLおよびPEOのグラフトコポリマーをマイクロカプセル表面に取り込ませることで、顕著に高まることが報告されている (Sawhneyら、「ポリ(L-リジン)-アルギン酸塩マイクロカプセル膜の生体適合性を高めるポリ(エチレンオキシド)-グラフト-ポリ(L-リジン)コポリマー」 (1991) *Biomaterials*, 13, 863-870)。

上記PEO鎖は、高度に水溶性であり、且つ高度に柔軟性である。PEO鎖は、水中で極度に高い運動性を有し、本質的に非イオン性の構造を有する。表面上へのPEOの固定は、主に、PEO側鎖を有するグラフトコポリマーの合成により行われる (Sawhneyら、; Miyamaら、1988; Nagaoら)。上記プロセスは、各用途に応じるモノマーおよびポリマーのカスタム合成を包含する。しかし、グラフトコポリマーの使用では、高分子により「認識」される表面が、完全にPEOから構成されるとは、まだ保証されない。

電子線架橋がPEOヒドロゲルの合成に使用され、このヒドロゲルは、非トロンボゲン形成性であることが、Sunら、(1987) *Polymer Prepr.*, 28:292-294; Dennison, K.A.、(1986) Ph.D.論文、マサチューセッツ工科大学

により報告されている。しかし、電子線の使用は、その照射が細胞毒性であるため、このポリマーと共に用いても、いずれの生組織の存在をも妨害する。また、電子線により誘導される非特異的架橋のために、この方法により形成される網目構造は、特徴付けが困難である。

短波長の紫外光の存在下で開始するPEGジアクリレートの光重合が、発酵および化学的変換のために酵母細胞の包括に使用された (Kimuraら、(1981) 「ヌクレオチドの発酵性リン酸化における、酵母の固定化した解糖系のいくつかの特性」 *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11:78-80; Omataら、(1981)、「有機溶媒中の、ゲルに包括されたロドトルラ・ミヌタ・uzr・テクセンシス細胞によるdl-コハク酸メチルの立体選択性的加水分解」 *Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol.*, 11:199-204; Okada, T. ら、「包括された増殖酵母細胞のペプチド分泌系への適用」 *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 26, 112頁-116頁 (1987)。短波長紫外光照射で光重合可能な材料中へ細胞をカプセル化する他の方法が、微生物細胞に使用された (Kimuraら、1981; Omataら、1981; Okadaら、1987; Tanakaら、1977; Omataら、1979a; Omataら、1979b; Chunら、1981; Fukuiら、1976; Fukuiら、1984)。しかし、酵母細胞および数種の微生物細胞は、劣悪な環境、高温、および短波長紫外光照射に対し、哺乳類細胞およびヒトの組織よりもずっと丈夫であり抵抗性である。

上記方法にはいくつかの問題がある。それらは、トロンボゲン形成性であるかまたはインビボで不安定であり、あるいは、哺乳類の生組織または生物学的に活性な分子を破壊する傾向のある重合条件 (例えば、短波長紫外光照射) を必要とするような方法および/または材料の使用を包含する。ヒトまたは他の哺乳類被験体への移植用に、生組織をカプセル化するには、重合条件により生組織が破壊されてはならず、そして生成するポリマーコーティング細胞は生体適合性でなければならない。

また、材料を、栄養素および気体に対し透過性があり、なおかつ強靭で非免疫原性である材料の非常に薄い層中にカプセル化する必要がある。例えば、過去においては、ランゲルハンス島の移植には、その脾島 (100から200ミクロンの直径を有する) を、400から1000ミクロンの直径を有するミクロスフェアにカプセル化してきた。この大きな直径のために、結果として、栄養素分子の拡散が遅延され得、移植容積が大きくなり得る。

すなわち、生体適合性であり、特異的または非特異的な免疫応答を誘起せず、且つ生細胞または組織と、その細胞を傷つけ、または殺すことなく接觸して、非常に短い時間枠の中で、非常に薄い膜に重合され得る、細胞および組織または生物学的に活性な分子をカプセル化する材料およびその使用方法が必要とされる。これらの材料のインビボでの使用の1つの重要な局面は、それらが、短い外科的処置の時間内に、あるいは、カプセル化され

る材料が分散し、損傷したまでは死滅する前に、重合されなければならないことである。

従って、本発明の1つの目的は、生細胞および組織と接触して、非常に短い時間で重合され得る重合材料を提供することである。

本発明のさらなる目的は、生体適合性で、特定の時間にわたり分解に対して抵抗性である重合材料を提供することである。

本発明のなおさらなる目的は、栄養素および気体に対し透過性であり、なおかつ他の細胞によるインビボでの攻撃から細胞および組織を保護し得る重合材料を提供することである。

#### 発明の要旨

本明細書は、可視光または長波長の紫外光 (1w uv 光、320nmまたはそれ以上) を用いる、直接または間接的に生組織を、その細胞、組織またはそれらの担持体の表面に適合するポリマー性コーティングでカプセルをコーティングする、迅速で穏やかな重合条件下における、マクロマーの重合方法を開示する。ポリマーは、本明細書中でマクロマーと称される無毒性プレポリマーから形成される。このマクロマーは、水溶性または実質的に水溶性であって、そして十分な大きさを有するため、コーティングされる細胞中には拡散しない。例えば、マクロマーとしては、高度に生体適合性のPEGヒドロゲルが挙げられ、このヒドロゲルは、酸素の存在または非存在下で、有毒な重合開始剤を使用せずに、室温または生理的温度で、そして生理的pHで迅速に形成され得る。重合は、可視光または1w uv光で光重合可能なメチレンブリーマまたはエオシンYのような無毒性の色素を使用して開始され得る。細胞中に拡散するが、無毒性である他の色素（例えば、エチルエオシン）もまた使用され得る。適切な発色団の非存在下では、細胞にはほとんど光が吸収されないので、本プロセスは無細胞毒性である。細胞タンパク質および核酸により強く吸収され細胞毒性となり得る短波長UV照射に対するのとは逆に、この光に対しては、細胞はほとんど透明である。通常、ほとんどのマクロマーでは、ミリ秒から数秒の間の時間内に重合を起こすには、低レベルの照射（5～500mW）で十分である。細胞毒性がない第2の理由は、重合可能な種が細胞中に拡散しないことである。

生成するポリマーは、半透膜、組織支持体としての粘着剤、プラグ、1細胞組織と他の細胞または組織との相互作用を防止するバリア、および生体活性種のキャリアとして働き得る。異なる幾何を有する多様な表面は、これらの重合材料の3次元的に架橋された網目構造でコーティングされ得る。このポリマーは、タンパク質、多糖、薬物活性を有する有機化合物、および核酸を包含する生物学的に活性な材料の送達用のマトリックスに形成され得る。

1つの好ましい実施態様では、このポリマーは、構造

支持、管腔表面での血栓症および炎症反応の防止、および／または血管への治療薬の送達のために、血管の管腔の内面上に層を形成するのに使用される。他の好ましい実施態様では、このポリマーは、ランゲルハンス島のような細胞の周囲に半透性障壁を形成して、免疫グロブリン分子または細胞の通過を阻止するが、一方栄養素、気体および小型の細胞産物を自由に通過させることで、その細胞を保護するために使用される。このように処理された脾島細胞は、代謝プロセシングの欠陥に起因する疾患、または生体調節材料分子の濃度が不十分であることから生じる糖尿病のような疾患の治療に有用であり得る。

#### 図面の簡単な説明

図1は、エチルエオシン開始重合の反応スキームである。

図2Aは、架橋アルギン酸塩ミクロスフェアの周囲のPEG層の色素開始重合の模式図である。

図2Bは、図2Aに記載される色素結合法を用いて、PEG18.5Kテトラアクリレートヒドロゲルでコーティングされた、ヒトのランゲルハンス島を含有するアルギン酸塩／ポリ（L-リジン）ミクロスフェアの光学顕微鏡写真である。

図3は、鰯油中に懸濁されたアルギン酸塩-ポリ（L-リジン）ミクロスフェア上のPEGコーティングの光重合の模式図である。

図4は、PEG18.5Kテトラアクリレートヒドロゲル中にカプセル化されたヒトすい臓から単離されたランゲルハンス島の光学顕微鏡写真である。

図5は、レーザー重合を使用するマイクロカプセル化に用いられる共抽出装置の模式図である。

図6は、PEG400ジアクリレートのレーザー重合により、細胞の周囲に形成されるミクロスフェアの光学顕微鏡写真である。

図7Aは、マウスで、腹腔内移植の4日後に回収された、アルギン酸塩-PLLミクロスフェアの光学顕微鏡写真である。

図7Bは、図1中に記載される色素拡散法を使用して、PEG18.5Kダルトンのテトラアクリレートでコーティングされたアルギン酸塩-PPLミクロスフェアの光学顕微鏡写真である。

図8AからFは、ゲル組成物に対する細胞数のグラフであり、以下に示す異なるPEOオーバーコーティングゲル組成物で、マウスの腹膜腔を洗浄して得られた非付着細胞について示す:a-18.5k; b-10%0.5k, 90%18.5k;c-50%18.5k, 50%0.4k;d-10%0.4k, 90%35k;e-50%0.4k, 50%35k;および;f-アルギン酸塩-ポリ（L-リジン）コントロール。

図9は、時間（分）に対する放出タンパク質の%を示すグラフである。ウシ血清アルブミン（□）、ヒトIgG（▲）およびヒトフィブリノーゲン（■）の、PE018.5K

テトラアクリレートゲルを通しての拡散を示す。

図10は、PEO400ジアクリレート(□)およびPEG18.5K-テトラアクリレート(▲)ゲルを通過するウシ血清アルブミンの拡散%の経時変化(分)のグラフである。

図11Aは、トリメチロールプロパンの対数値(時間)(ミリ秒)に対する、アミンおよびエチルエオシン開始系を用い、アルゴンイオンレーザー誘発重合により形成されるゲルの長さをmmで表すグラフである。

図11Bは、エトキシ化されたトリメチロールプロパントリアクリレートに、67ミリ秒、125ミリ秒、250ミリ秒、500ミリ秒および1秒の持続時間のレーザー照射の結果形成された突起の光学顕微鏡写真である。

図12Aは、6時間、カバーガラス上で培養された、PEG18.5K-テトラアクリレートゲルでコーティングされたヒト包皮線維芽細胞の光学顕微鏡写真である。

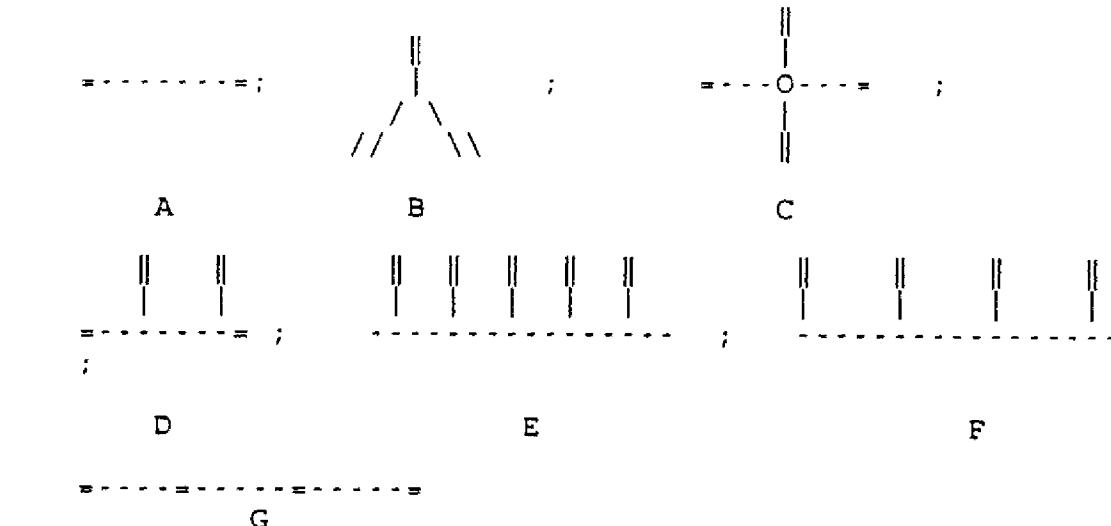
図12Bは、6時間、カバーガラス上で培養された、PEGでコーティングされないヒト包皮線維芽細胞の光学顕微鏡写真である。

図13は、マウスに移植され、4日後に体外移植され、非常に少ない纖維性の過増殖しか示さないPEG18.5K-テトラアクリレートミクロスフェアゲルの光学顕微鏡写真である。

図14AからCは、PEGジアクリレートおよびテトラアクリレートゲルのクリープ曲線である；試験荷重および除荷重を、横座標の下に示す：A-1k; B-6K; およびC-18.5K PEGゲル。

#### 発明の詳細な説明

本明細書中に記載されているように、生体適合性ポリマー材料は、少なくとも2つの重合可能な置換基を有する生体適合性水溶性マクロマーをフリーラジカル重合することによって、生物学的に活性な材料または細胞および組織と並列して用いられるように形成される。これらのポリマーコーティング材料は、ホモポリマー、コポリマーまたはブロックコポリマーのいずれかであり得る。



本明細書中で使用されているように、ポリマーは、10より大きい重合度を有して形成される単位であり、オリゴマーは、2と10との間の重合度を有する。重合度とは、構造中の繰り返し単位の数を意味し、例えば、d.p.=3はオリゴマーを指す。少なくとも2つの重合可能な置換基を有する成分の重合は、ゲル化と同等であり、重合が進むと3次元的な架橋ゲルが形成される。

ゲルを形成するのに有用なプレポリマー(マクロマー)

生物学的材料または細胞と接触して重合され得るプレポリマー(以後、マクロマーと称する)の一般的な基準は、以下の通りである：プレポリマーは、水溶性または実質的に水溶性であり、フリーラジカル重合によってさらに重合または架橋され得、無毒性であり、非常に大きいので、すなわち、200より大きい分子量を有するためには細胞中に拡散されない。実質的に水溶性であるとは、本明細書中では、水と有機溶媒との混合物中に溶解し得ることであると定義される。この場合、水は、溶媒混合物の大半を占める。

本明細書中で使用されているように、マクロマーは、光のみを用いて、またはフリーラジカル光重合開始剤のような開始剤および/または触媒の存在下で光重合されなければならない。ここで、光は可視光または長波長紫外光の範囲、すなわち、320nm以上である。他の反応条件は、カプセル化される生組織の生存能力に悪影響を与えるなければ、フリーラジカル重合を開始するのに適切であり得る。マクロマーはまた、重合の間に生組織に毒性であるような生成物または熱レベルを生じてはならない。触媒またはフリーラジカル開始剤もまた、使用条件下で毒性であってはならない。

種々の実質的に水溶性のポリマーが存在する。そのいくつかを以下に概略的に示す。( )は、ポリマーの実質的に水溶性の領域を示し、(=)は、フリーラジカル重合可能な種を示す。その例としては、以下が含まれる：

れるPEGトリアクリレート、Cの例としては、PEGをシクロデキストリン中央環にグラフトし、さらにアクリル化することによって形成されるPEG—シクロデキストリンテトラアクリレート、Dの例としては、2つのPEGジオールをビスエポキシドにグラフトし、さらにアクリル化することによって形成されるPEGテトラアクリレート、Eの例としては、ヒアルロン酸鎖上の多くの部位をアクリル化することによって形成されるヒアルロン酸メタクリレート、Fの例としては、PEGをヒアルロン酸にグラフトし、さらにアクリル化することによって形成されるPEG—ヒアルロン酸マルチアクリレート、Gの例としては、PEGジオールを不飽和二塩基酸でエステル化することによって形成されるPEG不飽和二塩基酸エステルが挙げられる。

多糖には、例えば、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、キトサン、ゲランガム、キサンタンガム、グアーガムおよびK-カラゲナンが含まれる。タンパク質には、例えば、天然源または組換え源から生成される、ゼラチン、コラーゲン、エラスチンおよびアルブミンが含まれる。

光重合可能な置換基は、好ましくは、アクリレート、ジアクリレート、オリゴアクリレート、ジメタクリレート、またはオリゴメタクリレート、および他の生物学的に受容可能な光重合可能な基を包含する。

#### 合成ポリマー・マクロマー

水溶性マクロマーは、ポリ(エチレンオキシド) (PEO)、ポリ(エチレングリコール) (PEG)、ポリ(ビニルアルコール) (PVA)、ポリ(ビニルピロリドン) (PVP)、ポリ(エチルオキサゾリン) (PEOX)、ポリアミノ酸、擬ポリアミノ酸 (pseudopolyamino acids)、およびポリエチルオキサゾリンを包含するが、これらに限定されない水溶性ポリマー、また同様に、これらを互いにまたは他の水溶性ポリマーまたは非水溶性ポリマー(複合体が水溶性の場合)と組み合わせたコポリマーから誘導され得る。水溶性複合体としては、例えば、ポリエチレングリコールおよびポリプロピレンオキシドのブロックコポリマーが挙げられ、これはブルロニック<sup>TM</sup>界面活性剤として商業的に入手可能である。

#### 多糖マクロマー

アルギン酸塩、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デキストラン、デキストラン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、キトサン、ゲランガム、キサンタンガム、グアーガム、水溶性セルロース誘導体、およびカラゲナンのような多糖は、これらの多糖上のヒドロキシルまたはアミンとの反応によって結合する。これらの多糖もまた、マクロマー溶液を形成するのに用いられ得る。

#### タンパク質マクロマー

ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、ゼイン、および

アルブミンのようなタンパク質は、天然源または組換え源から生成され、アクリレート、ジアクリレート、メタクリレート、エタクリレート、2-フェニルアクリレート、2-クロロアクリレート、2-ブロモアクリレート、イタコネート、オリゴアクリレート、ジメタクリレート、オリゴメタクリレート、アクリルアミド、メタクリルアミド、スチレン基、または生物学的に受容可能な光重合可能な基を含む炭素-炭素の二重または三重結合を有する部分の添加によってフリーラジカル重合される。これらのタンパク質もまた、マクロマー溶液を形成するのに用いられ得る。

#### 色素感応性重合

色素感応性重合は、化学文献において周知である。例えば、アルゴンイオンレーザーからの光 (514nm) は、キサンチン色素および電子供与体 (例えばトリエタノールアミン) の存在下で、反応混合物中のアクリル基のフリーラジカル重合を誘導する働きをする (Neckersら, (1989) Polym. Materials Sci. Eng., 60:15; Fouassierら, (1991) Makromol. Chem., 192:245-260)。レーザー光の吸収後、色素は励起して三重項状態に至る。この三重項状態は、トリエタノールアミンなどの3級アミンと反応して、重合反応を開始するフリーラジカルを生成する。重合はきわめて迅速であり、マクロマーの官能性およびその濃度、光強度、および色素およびアミンの濃度に依存する。

#### 光重合開始色素

320nmと900nmとの間の周波数を有する光を吸収し、フリーラジカルを形成し得、少なくとも部分的に水溶性であり、そして重合に用いられる濃度では生物学的材料に対して毒性のないあらゆる色素が用いられ得る。光学的に重合を開始するのに用いられる感光性色素は多数あり、例えば、エチルエオシン、エオシンY、フルオレセイン、2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン、2-メトキシ-2-フェニルアセトフェノン、カンフアーキノン、ローズベンガル、メチレンブルー、エリトロシン、フロキシン、チオニン、リボフラビン、メチレングリーン、アクリジンオレンジ、キサンチン色素、およびチオキサンチン色素などがある。

好ましい開始色素としては、水溶液中の分光特性を考えるとエチルエオシンが挙げられる (最大吸収=528nm、消衰係数=1.1×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、最大蛍光=547nm、量子収量=0.59)。エチルエオシンを用いる反応スキームを例として図1に示す。色素は、照射後に漂白し、アミンと反応して無色の生成物とし、反応系の中へのビームのさらなる浸透を可能にする。

#### 助触媒

光重合開始色素と共に有用に用いられる助触媒には、フリーラジカル反応を刺激し得る窒素ベース化合物がある。1級、2級、3級、または4級アミンは、適切な助触媒であり、それらはいずれもの窒素原子を含有する電

子リッチな分子である。助触媒としては、例えば、トリエタノールアミン、トリエチルアミン、エタノールアミン、N-メチルジエタノールアミン、N,N-ジメチルベンジルアミン、ジベンジルアミン、N-ベンジルエタノールアミン、N-イソプロピルベンジルアミン、テトラメチルエチレンジアミン、過硫酸カリウム、テトラメチルエチレンジアミン、リジン、オルニチン、ヒスチジン、およびアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。

色素／光重合開始剤系としては、例えば、アミンを含むエチルエオシン、アミンを含むエオシンY、2,2-ジメトキシ-2-フェノキシアセトフェノン、2-メトキシ-2-フェノキシアセトフェノン、アミンを含むカンファーキノン、およびアミンを含むローズベンガルが挙げられる。

ある場合には、アミンのような開始剤を付加しなくても、色素は光を吸収し、重合を開始する。このような場合、露光によって重合を始めるには、色素およびマクロマーの存在のみが必要とされる。レーザー光を除去すると、フリーラジカルの発生が終わる。2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンのようなある種の光重合開始剤は、光重合を誘導するのに助剤アミンを全く必要とせず、これらの場合、色素、マクロマー、および適切な波長の光が必要とされる。

#### 重合手段

##### 光重合

好適な光源としては、以下の実施例に記載するような様々なランプおよびレーザーが含まれる。これらは、約320～800nm、最も好ましくは約365nmまたは514nmの波長を有する。

この光は、水銀ランプ、長波UVランプ、He-Neレーザー、またはアルゴンイオンレーザーのような所望の照射を生成し得る適切な光源によって、または光ファイバーを用いることによって提供され得る。

##### 他の重合手段

重合には光以外の手段も使用し得る。例えば、トリエタノールアミンを含有するまたは含有しない過酸化ベンゾイル、テトラメチルエチレンジアミンを含有するまたは含有しない過硫酸カリウム、および重亜硫酸ナトリウムを含有する過硫酸アンモニウムのような適度の温度でフリーラジカルを形成する、熱開始剤による開始が含まれる。

##### 生物学的に活性な材料の組み込み

水溶性マクロマーは、生物学的に活性な分子の周囲で重合して分子のための送達システムを形成し得るか、または、細胞、組織、細胞内小器官または他の細胞内成分の周囲で重合して生物学的材料をカプセル化し得る。水溶性マクロマーはまた、組織のカプセル化と同様に、重合により生物学的に活性な分子を組み込み、細菌増殖に対する抵抗性または炎症反応の低下のような新しい特性

をポリマーに付与し得る。タンパク質、ペプチド、多糖、有機または無機薬物、核酸、糖質、細胞、および組織を包含する幅広い種類の生物学的に活性な材料をカプセル化または組み込み得る。

カプセル化し得る細胞の例は、「初代培養細胞、および形質転換細胞を包含する確立細胞系を含む」。これらは、脾島細胞、ヒト包皮線維芽細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞、ベータ細胞島細胞腫、リンパ芽球白血病細胞、マウス3T3線維芽細胞、ドーパミン分泌腹側中脳細胞、神経芽細胞様細胞(neuroblastoid cells)、副腎髓質細胞、およびT細胞を含むがこれらに限定されない。このように一部を示しただけで分かるように、皮膚、神経、血液、器官、筋肉、腺、生殖、および免疫系細胞を含むあらゆるタイプの細胞、および固有の種を、この方法によって首尾よくカプセル化し得る。カプセル化し得るタンパク質の例は、ヘモグロビン、アデノシンデアミナーゼのような酵素、酵素系、血液凝固因子、ストレプトキナーゼおよび組織プラスミノーゲン活性化因子のようなインヒビターまたは凝固溶解因子、免疫用抗原、およびホルモン、ヘパリンのような多糖、アンチセシスのようなオリゴヌクレオチド、細菌および他の微生物(ウイルスを含む)、ビタミン、コファクター、および遺伝子治療用のレトロウイルスを、含む。

生物学的材料はまず、多糖ゲルのような構造に包囲され得る。(Lim, 米国特許第4,352,883号; Lim, 米国特許第4,391,909号; Lim, 米国特許第4,409,331号; Tsangら, 米国特許第4,663,286号; Goosenら, 米国特許第4,673,556号; Goosenら, 米国特許第4,689,293号; Goosenら, 米国特許第4,806,355号; Rhaら, 米国特許第4,744,933号; Rhaら, 米国特許第4,749,620号、これらは参照として本明細書中に援用される)。このようなゲルは、材料にさらなる構造的な保護、および副次的レベルの透過選択性を提供し得る。

##### 重合

好ましくは、マクロマーを重合開始剤と混合し、材料または重合されるべき部位に付与して、光または熱のような重合を開始する作因にさらす。

1つの好適な方法では、光開始系を、光重合可能なマクロマーの水溶液へ添加して水性混合物を形成する；生物学的に活性な材料を添加する；そして、水溶液に光を照射する。マクロマーは、好ましくは、光重合可能な置換基を有する水溶性ポリマーにより形成される。色素／重合開始剤系による光吸収により、重合を開始するフリーラジカルが形成される。

第2の好適な方法では、生物学的起源を有するもの、または動物における移植用の合成基体であり得る3次元物体の表面に、マクロマーをコーティングする。水溶性マクロマーを光開始剤系と混合して水性混合物を形成する；混合物をコーティングが行われる表面に付与して、コーティング表面を形成する；およびコーティングされ

た表面に光を照射してマクロマーの重合を開始する。

本実施例の変形例では、合成基体は親水性ミクロスフェア、マイクロカプセル、またはビーズであり得る。親水性ミクロスフェアを、光開始剤系と組み合わせて、水溶性マクロマー溶液と混合して水性混合物を形成する；ミクロスフェアをオイル中でマクロマーと攪拌により懸濁させてオイル懸濁液を形成し、そしてミクロスフェアに光を照射する。

別の特に好適な実施態様では、光感応性色素を、処理されるべき組織表面に吸収させ、吸収されなかつた色素を組織から希釈によりまたは洗浄により分離し、色素結合表面にマクロマー溶液を付与し、そして重合を開始する。この結果、界面重合が起こる。

重合は、バルク重合または界面重合を利用する少なくとも5つの異なる方法によって行われ得る。これらの実施態様について、重合の材料および方法の特定の適用に関して以下にさらに述べる。

#### バルク重合

バルク重合では、コーティングされる材料をマクロマー、光開始剤、および必要に応じて助触媒を含む溶液と接触させて置き、次いで例えば照射にさらすことによつて重合を誘導する。バルク重合の3つの例を以下に示す。

#### 材料をカプセル化するためのバルク懸濁重合法

カプセル化される生物学的材料を、マクロマー、助触媒、および必要に応じて促進剤を含有するマクロマー水溶液、および、重合開始剤と混合する。好ましくは、空気と、または好ましくは鉛油であるオイルのような非混和性物質と上記水溶液とを共押出(coextrusion)して液滴を形成するか、または水相をオイル相のような非混和性の相と接触させて攪拌して液滴を形成することによつて、球体、卵形、または長円形のような小さな球状幾何学構造を形成する。続いて球体中のマクロマーを照射にさらすことで重合させる。球体にはマクロマーおよび重合開始剤が閉じ込められているため、重合によって得られる構造は、生物学的材料を包囲するカプセルとなる。これが「懸濁重合」であり、これによつて球体の水性部分全体が重合して、細胞材料の周りに厚い膜を形成する。

#### マイクロカプセル懸濁重合法

バルク懸濁法の1つの変形例では、懸濁重合反応において、マイクロカプセル化材料をマクロマーが重合するコアとして用いる。まず、生物学的材料を、ミクロスフェア、マイクロカプセル、または微粒子（本明細書中では、総称してマイクロカプセルと称する）、例えばアルギン酸塩マイクロカプセル内にカプセル化する。次いでマイクロカプセルをマクロマー溶液および重合開始剤と混合して、マクロマー溶液を重合する。

この方法は、特にPEGマクロマーと共に使用する場合に適切であり、PEGマクロマーの高度な親水性を利用し

て、特にアルギン酸塩一ポリ(L-リジン)のようなヒドロゲルマイクロカプセルと共に使用する場合に良好に適用される。ミクロスフェアは水中で膨張する。触媒および/または重合開始剤または促進剤を含有するマクロマー溶液を、鉛油のような疎水性媒体中で相分離させると、PEGマクロマー溶液はアルギン酸塩マイクロカプセルの親水性表面上に留まる傾向にある。この懸濁液を照射すると、PEGマクロマーは重合して、ゲル化し、ミクロスフェアの周囲にポリマー性水不溶性ゲルの薄層が形成される。

この技術は、好ましくは、マクロマーおよび重合開始剤の溶液中のマイクロカプセルを共押出して、溶液を、水と非混和性である空気または液体と接触させるが、これは液滴が混和しない鉛油のような溶液に落下することで液滴を形成する。非混和性液は、液滴の形成を維持する能力によって選択される。さらに、膜カプセル化材料を動物に注入または移植する場合には、残留物は無毒性および非免疫原性でなければならない。鉛油は好適な非混和性液体である。液滴がこの非混和性液体に接触すると、これらは重合する。

この共押出し法により、厚さが50ミクロンより大きい架橋ポリマーコーティングが得られる。または、マイクロカプセルを、マクロマーおよび重合開始剤の溶液内で懸濁し、鉛油のような非混和性相と接触させて攪拌し得る。得られる乳剤を重合し、マイクロカプセルの周囲に、同じく厚さ50ミクロンより大きいポリマーコーティングを形成する。

#### バルク重合による組織接着法

ポリマー材料は、組織を接着するのにも使用され得る。光反応開始剤と組み合わせた水溶性の重合可能なマクロマーを、組織接着を行うのが望ましい組織表面に付与する。接着されるのが望ましい組織にこの組織表面を接触させて組織接合部を形成する。そして、組織接合部をマクロマーが重合されるまで光で照射する。好適な実施態様では、この工程は数秒間から数分間、最も好ましくは数秒間で完了する。

好適な実施態様では、このマクロマー混合物は、PEG400ジアクリレートまたはPEG18.5Kテトラアクリレートのような水溶液である。この溶液は、組織を覆う粘液または体液の湿潤層を有する組織に接触すると、その組織上の水分と混ざり合う。組織上の粘液層は、細胞表面に密に接触する水溶性多糖を有するが、これらは、糖タンパク質およびプロテオグリカンを豊富に含んでいる。このように、物理的な混合、および、クレバスへの浸透による表面結合力は、架橋に続いてPEGゲルを組織表面に接着させるのに寄与する力の一部である。

このような接着剤の特定の用途には、血管吻合、柔組織再結合、排液性火傷用包帯、および網膜再付着が含まれ得る。

#### 組織バリヤ形成のためのバルク重合

この材料は非常に親水性が高いために、PEGゲルが組織から離れて重合された場合、一般に、極度に接着力の欠如した表面が細胞および組織に形成される。

この性質を利用して、コーティングされた組織に細胞が付着するのを防ぐために、組織上にバリヤを形成することができる。その用途としては、例えば、バルク重合（マクロマーと混合した重合開始剤との）または界面重合（表面に吸収された開始剤との）によって、血栓症、血管痙攣または血管虚脱を防止するために、ラングルハンス島または血管管腔の上にバリヤを形成することが挙げられる。

#### 界面重合

界面重合では、フリーラジカル開始剤をコーティングされる材料の表面に吸着させ、すすぎ用溶液を用いるか、もしくはマクロマー溶液を使用して吸着されない開始剤を希釈もしくは洗い落し、必要に応じて助触媒を含有するマクロマー溶液を材料に付与し、次いで重合させる。界面重合の二つの例を以下に示す。

#### マイクロカプセル界面重合法

懸濁重合に関して上述したように、生物学的材料はカプセル化され得るが、これは生物学的材料またはマイクロカプセルの表面に膜を形成するために界面重合を利用するものである。これは生物学的材料またはマイクロカプセルを光反応開始剤でコーティングし、マクロマー溶液内で生物学的材料またはマイクロカプセルを懸濁し、そして例えれば照射によって直ちに重合させることを包含する。厚さ50ミクロン未満の薄いポリマーコーティングを、生物学的材料またはマイクロカプセルの周囲に形成する。これは、光開始剤がマイクロカプセル表面のみに存在しており、マクロマー溶液の内部深くに拡散するのに十分な時間を与えられないためである。

ほとんどの場合、色素などの開始剤は、生物学的材料またはマイクロカプセルの表面に吸着するだけでなく、その内部に浸透する。必要に応じてトリエタノールアミンなどの助触媒を含有するマクロマー溶液が、表面に付与され、レーザー光などの開始剤にさらされるとき、反応物中の必須成分は全て、生物学的材料またはマイクロカプセルとマクロマー溶液との界面および界面のすぐ内側にのみ存在する。従って、典型的には約100ミリ秒以内で起こるような、重合またはゲル化（多官能基性マクロマーを使用した場合）は、最初、界面、界面直下および界面のすぐ裏側でのみ生じる。これを長時間放置すると、開始剤はミクロスフェア内核から溶液内への拡散を開始する。同様に、マクロマーは核の内部で拡散を開始し、そして、より厚いポリマー層が形成される。

#### 直接界面重合法

膜を組織表面に直接形成するための界面重合である。組織は開始剤で直接コーティングされ、余分な開始剤は除去される。マクロマー溶液を組織に付し、重合させる。

#### ポリマー透過率の制御

コーティングの透過率は、ポリマーの分子量および架橋により、ある程度決定される。例えば、架橋間のPEG鎖が短い場合、網目構造内でつくられる「ポア」は比較的堅固な境界を有しており、比較的小ないので、このゲルを通して拡散しようとする高分子は、ふるい分け効果によって選択的に制限される。架橋間の鎖の長さが長い場合は、鎖は折れ曲がったり高い運動性を有して動き回ったりし得るので、拡散する高分子は、ふるい分け効果だけでなく自由体積排除効果を受ける。

この二つの相反する効果があるために、拡散のための分子量カットオフと開始オリゴマーの分子量との間の直接的な関係は、完全には定義され得ない。しかし、架橋密度およびPEGセグメントの長さを調節することにより、ペプチドのような特定のタンパク質または薬物に対する所望の放出プロファイルが達成され得る。従って、所望のタンパク質透過性プロファイルは、移植された細胞または組織を保護するために細胞がゲル内に進入することを可能にし、そして、抗体および補体タンパク質のような免疫モジュレータの拡散を制限する一方で、栄養素、酸素、二酸化炭素、老廃物、ホルモン、成長因子、輸送タンパク質、および、分泌細胞合成産物（例えばタンパク質）が拡散することを可能にするように設計され得る。この三次元架橋の共有結合ポリマー網目構造は、インビボでの長時間の使用に対しても化学的に安定している。

細胞および組織を、抗体は膜を透過できないが細胞代謝作用に不可欠な栄養素は透過できるようにしてカプセル化するために、好適な開始マクロマーの大きさは、10,000Dと18,500Dとの間の範囲にあり、最も好ましくは約18,500Dである。マクロマーが小さければ、より小さなポアを有する、より高密度のポリマー膜が得られる。ポリマー層の厚さおよび形態

膜の厚さは、透過選択性、硬さ、膜の大きさを含む種々のパラメーターに影響を与える。反応成分および/または反応条件を選択することにより、厚さは変更され得る。例えば、マクロマー濃度は、マクロマーの種類によって、数%から100%まで変更され得る。同様に、強い照射および長時間の照射により、弱い照射または短時間の照射で得られるよりも厚いフィルムがつくられる。促進剤もまた、厚さを調節するために種々の濃度で添加され得る。例えば、N-ビニルピロリジノンが、促進剤として添加され得、これは、他の条件が全く同じであっても、高い濃度においては低い濃度の場合よりも厚い層を生成する。例えば、N-ビニルピロリジノンの濃度は、0~0.5%であり得る。

界面重合法では、形成されるポリマー膜の厚さを調節するために、重合の持続時間が変更され得る。膜厚さと照射持続時間との間の相互関係は、光開始剤が一定速度で拡散し、その拡散が連続的に発生するプロセスである

ことに起因する。従って、照射持続時間が長いほど、光開始剤はマクロマー混合物中の重合をよく開始させ、マクロマーはよく重合し、得られる膜は厚くなる。膜厚に影響を与える付加的な要素は、マクロマー当りの反応基の数、およびマクロマー溶液中の促進剤の濃度である。この技術により、非常に薄い膜をつくることが可能になるが、これは、光反応開始剤が最初、生物学的材料表面の非常に薄い層の中に存在し、そして、重合が光反応開始剤が存在する場所でのみ起こるからである。

懸濁重合法では、マクロマー溶液全体に重合が起こるので、界面重合法で得られる膜より幾分厚い膜が形成される。懸濁重合法で形成される膜の厚さは、マクロマー溶液の粘度、その溶液中でのマクロマーの濃度、懸濁液の流体の機械的環境、および懸濁液中の界面活性剤によって、ある程度決定される。これらの膜の厚さは、50ミクロンと300ミクロンとの間の範囲で変動する。

#### 非生物学的表面

マクロマー溶液および重合開始剤は、生物学的環境と接触して配置することを予定される非生物学的表面にも付与され得る。そのような表面は、例えば、移植血管片、コンタクトレンズ、眼内レンズ、限外濾過膜、および生物学的材料用の容器を包含する。

通常、非常に異なる物理化学的特性を有するポリマー間で良好な接着を得ることは、困難である。表面物理的浸透網目構造の概念が、DesaiおよびHubbel (N.P. Desaiら (1992) ) によって示された。一つのポリマーの表面に非常に異なった特性を持つポリマーの完全なコーティングを取り入れるこの方法は、ベースポリマーおよび組み込まれるポリマー（浸透ポリマー）に対して、改変されるべきポリマー（ベースポリマー）の表面を共通溶媒、あるいは膨潤溶媒中で膨潤させることを包含する。浸透ポリマーが、ベースポリマーの表面に拡散する。この界面は、ベースポリマーを非溶媒浴中に置くことによって急速に表面を沈殿あるいは脱膨潤させることによって、安定化される。この結果、表面物理的浸透網目構造と呼ばれる構造において、ベースポリマーの表面でベースポリマーのマトリックス中にある浸透ポリマーがからみあう。

この方法は、膨潤状態でベースポリマーの表面の浸透ポリマーを光重合することによって、改善され得る。この結果、上記方法の安定性よりもさらに高い安定性が得られ、これらの材料に対する生物学的応答が高められる。浸透物は、プレポリマーであるマクロマー、すなわち、それ自身が重合し得るように化学的に改変され得る。この重合は、熱的に、あるいは可視光、紫外光、赤外光、ガンマ線、電子ビーム照射、あるいはプラズマ状態にさらすことによって開始される。比較的非特異的なガンマ線あるいは電子ビーム照射による反応の場合は、特別に反応性部位を化学的に組み込むことは必ずしも必要ではない。

ポリエチレングリコール (PEG) は、細胞が接着しないことが所望される生医学的用途には、特に有用な浸透ポリマーである。以前の研究では、化学的架橋なしで分子量18,500Dで最もよい性能を示している。PEGプレポリマーは、末端あるいは鎖中のどの部位においてでも水酸基をアクリル化することによって、容易に形成され得る。これらのプレポリマーは容易に重合され得る。これらのプレポリマーの光開始重合は、特に便利で迅速である。特定の光化学的反応色素による光吸収によって開始される様々な可視光開始反応および紫外光開始反応がある。これと同様の方法が、ポリ (N-ビニルピロリジノン)、ポリ (N-イソプロピルアクリラミド)、ポリ (エチルオキサゾリン) およびその他の多数の水溶性ポリマーと共に使用され得る。

#### 高分子材料の形成方法

高分子材料は、当業者に公知の標準的技術によって、所望の形状に形成される。ここで、マクロマー溶液、好ましくは触媒および重合開始剤を含有するマクロマー溶液を形状化し、重合する。例えば、スラブは平面上で注型することによって形成され得、ディスク形はディスク型の容器に注型することによって形成され得る。シリンドラーおよびチューブは押出しによって形成され得る。球は乳化油から、油との共押出し、あるいは空気、その他のガスあるいは蒸気との共押出しによって形成され得る。次いで、マクロマーを重合を開始するために光照射などの状況にさらす。このような照射は形状化処理に統いて、あるいは所望のときは、形状化処理と同時に行われ得る。

マクロマーは、内部支持構造あるいは外部支持構造との関連においても形状化され得る。内部支持構造は、安定なあるいは分解可能なポリマーあるいは無毒性の金属のスクリーン状網目構造を含む。外部構造は、例えば、シリンドラー内にゲルを注型し、シリンドラーの内部表面に生物学的材料を含有するゲルが張り付くようにすることを含む。

#### 表面コーティングの方法

これらの材料は、限外濾過、血液透析、動物組織の非マイクロカプセル化免疫的隔離に適用され得る。この場合のマイクロカプセルは、通常、70,000Da以下カットオフの分子量で微孔を有する。これは、中空纖維、らせんモジュール、平板、あるいはその他の形状であり得る。そのようなマイクロカプセルの表面は、PEGなどのポリマーを使用して改変し得、非汚損、非トロンボゲン、非細胞接着表面を生成する。コーティングは、生体適合性を高め、付加的な免疫保護を提供するために役立つ。このような方法で改変され得る材料は、ポリスルホン、セルロース膜、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリイミド、ポリベンゼイミダゾール、ナイロン、ポリ (アクリロニトリル-co-ビニルクロライド) コポリマー、ポリウレタン、ポリスチレン、ポリ (スチレン-co-アクリ

ロニトリル)、ポリ(塩化ビニル)およびポリ(エチレンテレフタレート)を含む。

表面の物理的および化学的性質に従って、様々な方法が、生体適合性保護膜を形成するために用いられ得る。親水性表面は、適切な量の色素およびアミンを含有するPEGジアクリレートなどの、重合可能な溶液の薄い層(例えば、50と300ミクロンとの間の厚さ)を付与することによってコーティングされ得る。疎水性表面を、まずガスプラズマ放出処理によって親水性にし、得られた表面を同様にコーティングし得、あるいは、PEGジアクリレート溶液による処理の前あるいは処理の間に界面活性剤によって簡単に処理してもよい。例えば、疎水性のポリスチレン表面は、まず $O_2$ プラズマあるいは $N_2$ プラズマへさらすことによって処理され得る。この結果、酸素含有表面種あるいは窒素含有表面種を各々生成することによって、表面はより親水性になる。これらの種は、表面に結合したフリーラジカル反応性種を生成し得るアクリロイルクロライドなどの物質との反応によって、さらに処理され得る。あるいは、疎水性ポリスチレン表面はまず、ポリ(エチレンオキシド)-ポリ(プロピレンオキシド)プロックコポリマーなどの界面活性剤で処理され得るが、所望であればこの後にアクリル化され得る。このような処理によって、親水性コーティング層と処理されている疎水性材料との間の接着が強くなる。

#### テクスチャー化材料およびヒドロゲルの処理

織ダクロン、ダクロンペロア、膨張ポリ(四フッ化エチレン)(ePTFE)膜などの一定度合の表面テクスチャーを有する材料の表面は、ヒドロゲルで処理され得る。テクスチャー化された多孔性表面によって、材料表面へのPEGゲルの接着が増強され、PTFEおよびポリ(エチレンテレフタレート)(PET)などの比較的疎水性の材料をコーティングし得るようになる。

ヒドロゲル(例えば、ポリ(HEMA)、架橋ポリ(ビニルアルコール)およびポリ(ビニルピロリドン))をその表面に有する酵素感応およびイオン感応電極などの移植可能な材料は、以下の実施例でアルギン酸塩-PLLミクロスフェアに使用される色素吸着技術および重合技術に類似の方法で、より生体適合性のPEOゲルでコーティングされる。

#### 緻密な材料の処理

ゲルのコーティング(gen coating)は、PET、PTFE、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリスルホン、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ガラスおよびセラミックを含むポリマーのような緻密(例えば、非テクスチャー化、非ゲル)材料の表面に付与され得る。初めに疎水性表面をガスプラズマ放出あるいは界面活性剤によって処理し、表面を親水性にする。これによって、表面へのゲルのコーティングの接着がより確実になる。あるいは、ポリマー合成および表面改変に関する当業者に容易に明らかであるように、カッ

プリング剤を接着を増強するために使用してもよい。血管内およびその他の組織上への界面重合による薄いコーティング

上記の方法論は、非分解性のポリマーコーティングの非常に薄い膜を光重合するために、血管と共に使用され得、血管壁と血小板との相互作用を変え、かつ、酵素およびその他のタンパク質のような治療薬、ヒアルロン酸などの多糖、アンチセンスおよびリボザイムのような核酸、およびその他の有機および無機薬物を送達する。

血管内のポリマー重合の直接の効果は、損傷血管表面のトロンボゲン形成を減少させることである。これは、毛管のトロンボゲン形成およびバルーン拡張による外傷の発生を減少させることによって、バルーン血管形成の結果を改善することにおいて、明確な有用性を持つ。この改変の他の効果は、平滑筋細胞増生を減少させることであり得る。これは、二つの理由から予期される。第1に、血小板は有効な成長因子、血管形成後増生に関係があると考えられている血小板由来成長因子(PDGF)を含む。血小板によって送達される「薬物」が送達されるのを防止するという点で、PDGF自体の送達の中止によって、薬理学的介入が引き起こされる。血栓症によって公知の平滑筋細胞分裂促進物質であるトロンビンが生成される。トロンビン生成および血管壁への送出の中止によっても、薬理学的介入が引き起こされる。さらに、平滑筋細胞分裂促進物質として知られるプラズマに可溶のその他の成長因子がある。ゲル層は組織の表面上の透過選択性バリアを与え、それによってゲル層は血管形成後の増生を減少させることが予期される。さらにゲルは、血管をトロンビンなどの血管収縮薬へさらすことから保護することによって血管痙攣を減少させ、急性再閉鎖の発生を減少させ得る。

界面での重合の制限は、非常に重要な利点である。血管内の疾患損傷は、その形状が非常に不規則である。従って、バルーンなどのあらかじめ形状を持つ物体を使用して、血管に隣接する重合材料を含有すべき形態を形成することは非常に困難である。

組織との細胞相互作用を制御すること、あるいはバルクまたは界面重合によって同様のバリアを生成することが必要ないいくつかの他の器官がある。この方法論は、その他の器官にも、また特定の種類の細胞、あるいは例えば下記のような様々な代謝欠陥および疾患の治療のための酵素などの生物学的に活性な材料のカプセル化にも、同様に適用可能である。

##### (i) 神経伝達物質放出細胞のカプセル化

麻酔振せん、より一般的には「パーキンソン症」と呼ばれる疾患は、脳の線条中での神経伝達物質ドーパミンの欠乏によるものである。中脳腹側、神経芽細胞様細胞系あるいは副腎髓質由来の細胞などのドーパミン分泌細胞は、本明細書に記載の方法および材料を使用してカプセル化され得る。遺伝的に設計された細胞を含み、神経

伝達物質の前駆体、アゴニスト、個々の神経伝達物質の誘導体あるいは擬態、あるいは類似体を分泌する細胞もまた、カプセル化され得る。

(ii) 合成赤血球のためのヘモグロビンのカプセル化

遊離型のヘモグロビンは、PEGゲル中にカプセル化され、拡散を妨害するPEGの鎖長および架橋密度を選択することにより保持され得る。ゲルからのヘモグロビンの拡散は、ポリヘモグロビン（ヘモグロビンの架橋体である）の使用によりさらに妨害され得る。ポリヘモグロビン分子は大きすぎるため、PEGゲルから拡散できない。天然または架橋ヘモグロビンのいずれかに適切であるカプセル化が、合成赤血球の製造に用いられ得る。これらの高生体適合性材料からなる5ミクロン未満の小球中にヘモグロビンを包括することにより、架橋ヘモグロビンまたはリボソームでカプセル化したヘモグロビンに比較して循環時間が長くなる。

(iii) 代謝障害の矯正および化学療法のための酵素の包括化

酵素の欠損から生じる多くの疾患および欠陥がある。例えば、酵素カタラーゼの先天的欠損により、無カタラーゼ血症が起こる。PEGゲル網目構造中のカタラーゼの固定化は、この疾患を治療する酵素置換の方法を提供し得る。同様にグルコシダーゼの包括は、ゴシェ病を治療するのに有用であり得る。ウレアーゼを包括するマイクロスフェアのPEGゲルは、尿素をアンモニアに変換するために体外血液中で用いられ得る。アスパラギナーゼのような酵素は、腫瘍細胞によって必要とされるアミノ酸を分解し得る。これらの酵素の免疫原性のために、化学療法における直接的な使用が妨害される。しかし、このような酵素をPEGゲルに包括することにより、化学療法を首尾よく援護し得る。適切な製剤が、酵素の遅延放出または無放出のいずれかのために設計され得る。

(iv) 抗ヒト免疫不全ウイルス薬のインビボでの評価のための細胞のマイクロカプセル化

HIVに感染したまたは感染していないヒトのTリンパ芽球様細胞は、上記の他の細胞に関する記載のようにしてPEGゲル中にカプセル化され得る。これらのマイクロカプセルは、非ヒト動物に移植され得、次いで、試験薬剤で処理され得る。処理後、マイクロカプセルは回収され得、カプセル化細胞は、生育能力および機能正常性に対してスクリーニングされ得る。感染T細胞の生存は、薬剤の作用が成功したことを示唆する。薬剤評価に対するこのアプローチにおける報告されている問題点は生体適合性の欠如であるが、本明細書中に記載の高生体適合性ゲルはこの問題を解決する。

(v) 血管およびその他の組織内腔内における構造コーティングの重合

非常に薄く血管内にコーティングがされ得るように、より厚い構造ゲル層もまた、血管内で重合し得る。これらは、血管の突然の再閉塞を減少し、血管壁の断面を維

持し、血管痙攣を抑制し、あるいは平滑筋肉細胞の増生を減少し得る。これらのゲルは、バルク重合あるいは界面重合で製造され得、材料の架橋密度がより強く、高度になるほど、血管壁内の構造はより強くなる。この処理は、身体の多数の器官上あるいは器官内部で実行され得る。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様および利用法について記述するために提供するものであるが、本明細書に添付の請求の範囲に記載される以外は、本発明を制限することを意味しない。これら実施態様は、一緒にまとめて、本発明を実施するうえで、現在に理解されている最良形態の代表例を示す。

実施例1:PEG6Kジアクリレートの合成

分子量400Daおよび1,000DaのPEGアクリレートは、それぞれSartomer and Dajac Inc. から購入し得る。20gのPEG6Kジオールを、250mlの丸底フラスコ内の200mlジクロロメタンに溶解した。フラスコを0°Cに冷却し、1.44mlトリエチルアミンおよび1.3mlのアクリロイルクロライドを、乾燥窒素雰囲気下で常時、攪拌しつつ加えた。次いで、反応混合物を室温へ移行し、窒素雰囲気下で12時間、攪拌した。次いで、これを濾過し、濾過液に大過剰のヘキサンを加え、沈殿させた。粗モノマーをジクロロメタンに溶解し、ヘキサンで沈殿させて精製した。収率は60%。

実施例2:PEG18.5Kテトラアクリレートの合成

30gのテトラヒドロキシ水溶性PEG（分子量18,500）(PEG18.5K)をPolysciences, Incから購入した。

PEGをベンゼンに溶解し、水-ベンゼン共沸物を蒸留することにより、乾燥した。59gのPEG18.5Kを、500mlフラスコ内の300mlのベンゼンに溶解した。これに、3.6mlのトリエチルアミンおよび2.2mlのアクリロイルクロライドを、窒素雰囲気下で加え、反応混合物を2時間、還流した。次いで、冷却し、一晩攪拌した。濾過により、塩酸トリエチルアミンを分離し、濾過液に大過剰のヘキサンを加えて沈殿させて、コポリマーを回収した。ポリマーをさらに、塩化メチレンに溶解し、ヘキサン中に再沈殿させて精製した。ポリマーを真空中、50°Cで一日、乾燥した。収率68%。

実施例3:表面色素吸着による脾島含有アルギン酸塩-PPLマイクロスフェアのコーティング

マイクロカプセル界面重合法で、脾島を含有するアルギン酸塩-PPLマイクロカプセルの周囲に薄膜を形成した。1つあるいは2つのヒトの脾臓島細胞をそれぞれに含有するアルギン酸塩-PPLコアセルベートマイクロスフェアを、1.1%のCaCl<sub>2</sub>溶液に懸濁し、過剰液をアスピレータで除去し、濃密なマイクロスフェアプラグを得た。エチルエオシン溶液(0.04%W/V)を1.1%CaCl<sub>2</sub>溶液中に調製した。この溶液を、0.45μmのフィルターを通して、フィルター殺菌した。色素の吸い上げができるよう、マイクロスフェアのプラグを10mlのエオシン溶液に2

分間、懸濁させた。次いで、ミクロスフェアを、きれいな1.1%のCaCl<sub>2</sub>で4回洗浄し、過剰の色素を除去した。ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸(HEPE S)緩衝生理食塩水中に、3.5%W/Vのトリエタノールアミン溶液を100μlを含有するPEG18.5テトラアクリレートの溶液(23%W/V)2mlを、0.5mlのこれらのミクロスフェアに加えた。このミクロスフェアを30秒間、周期的に攪拌しながら、アルゴンイオンレーザー光に、さらした。ミクロスフェアの懸濁液を、この時間中、光で一様に走査した。ミクロスフェアを、次いで、カルシウム浴

液で洗い、さらにコーティングを安定化するために、この方法を繰り返した。

この技法でコーティングした臍島を含有する、アルギン酸塩/PLLミクロスフェアを図2に示す。

静的グルコース刺激試験(SGS)を、PEGゲルでコーティングしたミクロスフェア内にカプセル化された臍島上に実施した。この試みに関するインスリン分泌のデータを、表1に示す。臍島は、ジチゾン染色では、生存能力を有するよう見える。SGS試験データは、臍島の活性度と機能性を確認する。

表1：カプセル化臍島細胞機能SGS

グルコース濃度(mg%)

	初期値	終値	
	60	300	60
<u>インスリン／臍島／時間(μU/ml) *</u>			
拡散オーバーコーティング法	1.0	10.04±3.56	2.54±0.76
鉱油オーバーコーティング法	1.0	10.23±3.28	1.02±0.78
コントロール遊離臍島	1.0	3.74±1.4	1.9±0.17

\*値は平均±S.D.、300mg%グルコースにさらし、臍島を再び初期投与量にさらした後、すべてを初期値の60mg%グルコースに対し正規化した。

PEGジアクリレートマクロマーは、本実施例に記載のPEGテトラアクリレートマクロマーと同様にして重合され得る。

#### 実施例4:臍島含有アルギン酸塩-PLLミクロスフェア懸濁重合コーティング法

この方法は、PEGモノマーの親水特性を利用する。1つあるいは2つのヒト臍臓島細胞をそれぞれに含有する2mlのアルギン酸塩/PLLミクロスフェアを、50mlの透明な遠沈管内に、PEGテトラアクリレートマクロマー溶液(PEG分子量18.5KD、生理食塩水中23%溶液)と混合した。トリエタノールアミン(0.1M)および0.5mMエチルエオシンをマクロマー溶液と混合した。過剰のマクロマー溶液をデカンテーションして、20mlの鉱油を遠沈管に加え、反応混合物を5分間、ボルテックスにかけた。シリコーン油は、本合成において同様に作用するが、しかし、残留すれば、アジュバント特性は低下し得る。その他、水と非混和性のどんな液体も、「オイル」相として使用し得る。約1mMから約100mMの濃度範囲のトリエタノールアミンが受容され得る。約0.01mMから10mM以上の濃度範囲のエチルエオシンが受容され得る。

マクロマー／色素溶液の薄い被覆のために、ビーズはやや、赤色であった。これを20秒から50秒間、アルゴンイオンレーザー(出力50~500mW)で照射した。(赤色)のエチルエオシンの色の脱色は、反応の完了を示唆する。ビーズを次いで、鉱油から分離して、生理食塩水で数回洗浄した。全工程は、無菌状態で実施した。

オイル中のミクロスフェア(macrosphere)のコーティングプロセスの模式図を図3に示す。アルギン酸塩/ポリリジンカプセルは、pH12で、クエン酸ナトリウムに可溶である。これらのコーティングされたミクロスフェアは、pH12でクエン酸ナトリウムと接触させると、内部のアルギン酸塩/ポリリジンコアセルベートは溶解するが、PEG重合膜はまだ確認され得る(架橋PEGゲルは、水および、pH12のクエン酸ナトリウムを包含する全ての溶媒に実質的に不溶である)。コントロールのコーティングしていないミクロスフェアは、同じ溶液に完全にかつ急速に溶解する。

静的なグルコースの試みを、実施例3と同様にして、上記臍島に適用した。データをまた、表1に示す。上記臍島は生存能力を有し、機能的であった。

### 実施例5: ランゲルハンス臍島のカプセル化

この実施例では、直接界面重合法を用いた。ヒトのすい臓から分離されたランゲルハンス臍島をPEGテトラアクリレートマクロマーゲルにカプセル化した。10%のウシ胎児の血清を含有するRPMI1640培養液に懸濁した500の臍島を、100g、3分間、遠心分離してペレットにした。このペレットを、HEPES緩衝生理食塩水中の、1mlのPEG18.5Kテトラアクリレートマクロマーの23%W/V溶液に再懸濁した。ビニルピロリドン中のエチルエオシン溶液(0.5%濃度)5μlを、生理食塩水中のトリエタノールアミンの5M溶液100μlと共に、この溶液へ加えた。次いで、20mlの鉛油を、その遠沈管に加え、200~500μmの粒径の小滴の拡散物を形成するために激しく攪拌した。この分散液を250mWの出力、514nm波長のアルゴンイオンレーザーに30秒間さらした。次いで、ミクロスフェアを沈澱させることで鉛油を分離し、得られたミクロス

フェアを、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回、ヘキサンで1回、培養液で3回洗浄した。

図4は、PEGテトラアクリレートゲル中にカプセル化されたランゲルハンス島を示す。臍島の生存能力を、アクリジンオレンジおよびプロピジウムヨウ素染色法、およびまたジチゾン染色法により検査した。機能正常性を試験するために、SGS試験をこれらの臍島に実施した。カプセル化臍島の応答を、同じ時間、培地に置かれた遊離臍島の応答と比較した。SGSが実施される前の1週間、すべての臍島は、培地で維持された。結果は表2にまとめる。カプセル化臍島は、遊離臍島より有意に多い量( $p < 0.05$ )のインスリンを分泌することが判断され得る。PEGテトラアクリレートゲルのカプセル化プロセスは、臍島の機能を損なうことなく、また実際に、それらがカプセル化されなかつた場合より良好に、培地でその機能を保持するのを助ける。

表2. 臍島細胞からのインスリンの分泌

#### 臍島インスリン分泌

	グルコース濃度(mg%)		
	60	300	60
インスリン/臍島/時間(μU/ml) *			
遊離臍島	1.0	3.74 ± 1.40	1.9 ± 0.17
カプセル化臍島	1.0	20.81 ± 9.36	2.0 ± 0.76

\*値は平均±S.D. 60mg%グルコースの初期基準値に正規化  
実施例6:動物細胞のマイクロカプセル化

異なる分子量のPEGジアクリレートを、実施例1と同様に、アクリロイルクロライトとPEGとを反応させて合成した。図5に示す2軸空気流押出し装置(coextrusion air flow apparatus)を通してレーザー光を照射する前に、20%~30%のマクロマー溶液を、細胞懸濁液、エチルエオシン、およびトリエタノールアミン開始系と共に混合した。ミクロスフェアを、マクロマーの流れが、環状の空気流により噴霧されるプロセスで調整した。用いた空気流速度は1,600cc/分で、マクロマー流の速度は0.5ml/分であった。小滴を、中に鉛油を満たしたペトリ皿へ落下し、ミクロスフェアを重合し水に不溶性とするためにそれぞれ、約0.15秒間レーザー光にさらした。ミクロスフェアをオイルから分離し、PBS緩衝液で完全に洗浄し、未反応のマクロマーおよび残っている開始剤を除去した。ミクロスフェアの粒径および形状は、

押出し速度(0.05~0.1ml/分)および押出しキャビラリーの直径(18Ga~25Ga)に依存した。重合時間は、開始剤濃度(エチルエオシン濃度)(5 μM~0.5mM)、ビニルピロリドン濃度(0.0%~0.1%)、トリエタノールアミン濃度(5~100mM)、レーザー出力(10mW~1W)、およびマクロマー濃度(10%W/V)に依存した。

分子量400DaのPEGジアクリレートマクロマーは、助触媒としての0.1Mトリエタノールアミン、および光開始剤としての0.5mMのエチルエオシンを含有するPBS中の30%溶液として使用した。本法に使用するために調製した球を、図6に示す。重合は、空気の存在下で、生理的pHの条件下で実施した。ラジカル重合は酸素の存在により影響を受け得るので、このことは大切なことである。アクリレートの重合は、充分に速いので、効果的に進行する。

このプロセスはまた、より低温でも作動する。細胞力

カプセル化には、PEGジアクリレートの23%溶液を、空気噴霧技法で使用したのと同じ開始および重合条件で行った。カプセル化後の細胞生存能力を、トリパンブルー除去アッセイ (trypan blue exclusion assay) でチェックした。ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) 、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) 、およびベータ細胞胰島細胞種系 (RIN5F) は、カプセル後も、生育能力を有する (95%より高い) ことが判明した。10%より大きいPEGジアクリレートの濃度は、広範囲において、PEGテトラアクリレートマクロマーがそうであったように、等しく効果的に使用され得る。

#### 実施例7:動物細胞含有アルギン酸塩-PLLミクロスフェアおよび個々の細胞の表面色素吸着でのコーティング

動物細胞を含有する、アルギン酸塩-PLLコアセルベート化ミクロスフェアを1.1%CaCl<sub>2</sub>溶液に懸濁させ、そして吸引により過剰の溶液を取り除き、ミクロスフェアのプラグを得た。ミクロスフェアのプラグを10mlのエオシン溶液に2分間懸濁させ、色素を取り込ませた。HEPES緩衝生理食塩水中の、トリエタノールアミン溶液 (3.5 w/v) 100μlを含むPEG18.5Kテトラアクリレート溶液 (2.3%w/v) 2mlを、ミクロスフェア0.5mlに加えた。ミクロスフェアを、周期的に攪拌しながら、アルゴンイオンレーザーに30秒間さらした。この間、ミクロスフェアの懸濁をレーザーで均一に走査した。次いで、ミクロスフェアをカルシウム溶液で洗浄し、そしてこの操作をもう一度繰り返すことにより、安定なコーティングが得られた。

オーバーコーティングの工程後で細胞が生存していることを証明するため、アルギン酸塩/PLLマイクロカプセルを存在させずに懸濁した細胞を同様の重合条件にさらした。リンパ芽球性白血病細胞 (RAJI) ( $5 \times 10^5$ 個の細胞) 1mlを300gで3分間遠心した。エチルエオシン溶液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 化した、0.04%の滅菌濾液1mlを加え、そしてペレットを再懸濁させた。細胞を色素に1分間さらし、そしてPBSで二度洗浄し、次いでペレット化した。トリエタノールアミン溶液 (0.1 M) 10μlをペレットに加え、そして遠沈管をボルテックスにかけ、細胞を再懸濁させた。次いで、PEG18.5Kテトラアクリレートマクロマー0.5mlをこの懸濁に混合し、そして得られた混合物をアルゴンイオンレーザー (514nm、50mW) に45秒間さらした。次いで、細胞を生理食塩水10mlで二度洗浄し、そして培地 (10%FCSおよび1%抗生物質、抗真菌性物質を含むPMRI1640) で一度洗浄した。PEGテトラアクリレートゲルの薄膜が個体細胞の周辺に形成されるのが観察された。

トリパンブルー除去法によると、コントロール細胞群 (93%生存) と処理細胞 (95%生存)との間には生存率の有意な差異は認められなかった。細胞の生存率および機能に関するアッセイが、RAJI細胞に対して、MTT-ホルマザンアッセイにより行われた。このアッセイにより

90%を越える生存率が示された。類似のアッセイが、別の2種のモデル細胞系に対しても行われた。チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) は、MTT-ホルマザンアッセイの評価によると、代謝機能において有意な差異を示さない ( $p < 0.05$ )。3T3マウスの線維芽細胞もまた、代謝活性において有意な変化を示さない ( $p > 0.50$ )。

#### 実施例8:動物細胞含有アルギン酸塩-PLLミクロスフェアの懸濁重合によるコーティング方法

実施例4に記載の方法を用い、アルギン酸塩-PLLミクロスフェアに包括されたRAJI細胞を、PEG18.5Kテトラアクリレートポリマー膜でコーティングした。これらの細胞の生存率を、トリパンブルー除去法により検査し、そして95%を越える生存率を示した。

#### 実施例9:個々のランゲルハンス島の表面色素吸着によるコーティング

実施例7に記載の方法を用い、エチルエオシンを脾島の表面に吸着させ、そしてトリエタノールアミンを含むPEGマクロマー溶液を、色素でコーティングされた細胞に付与した。細胞にアルゴンイオンレーザー光を照射して、脾島の表面に厚いPEGポリマー膜を形成した。脾島の生存率を、プロピジウムヨウ素による染色の欠如から評価した。

#### 実施例10:ミクロスフェア上のPEGの生体適合性

実施例7および8で調製されたミクロスフェアの炎症反応の程度のインビボでの評価を、マウスの腹腔内にそれを移植することにより行った。およそ0.5mlのミクロスフェアを、滅菌したHEPES緩衝生理食塩水5ml中に懸濁させた。この懸濁液2.5mlを、ICR雄スイスホワイトマウス (swiss white mice) の腹腔内に注入した。4日後、10Uヘパリン/ml PBS5mlで腹腔を洗浄することによりミクロスフェアを回収した。ミクロスフェアまでの細胞増殖の程度を、位相差顕微鏡で視覚的に検査した。回収した洗浄液中に存在する未付着細胞の数をコールターカウントで測定した。

図7Aは、4日後に回収したアルギン酸塩-ポリ (L-リジン) ミクロスフェアの写真を示し、対して図7Bは、移植前に色素拡散プロセスによりPEGゲルをコーティングした類似のスフェアを示す。予想された通り、外側のアルギン酸塩層を含まない二層のアルギン酸塩-ポリリジンカプセルは、細胞のPLL表面への高い粘着性により、細胞に完全に覆われた。一方、PEGでコーティングしたミクロスフェアは、実質的に粘着細胞から離れていた。ポリリジンは表面にアミノ基を有し、そして正の電荷を有する表面のアミノが細胞表面のプロテオグリカンと相互作用し得、さらに細胞の増殖を助け得るため、アルギン酸塩-ポリ (L-リジン) のほぼ完全な被覆が予想された (Reuvenyら、(1983) Biotechnol. Bioeng., 25:469~480)。図7Bの写真は、PLLの高度に電荷を有する細胞粘着表面が、PEGゲルの安定な層により覆われる

こと強く示唆している。ゲルは妥協のない完全なものであった。

これらミクロスフェアの細胞非粘着傾向を、過増殖した細胞で覆われた全ミクロスフェア領域の百分率として評価した。これらの結果を表3にまとめる。

表3:過増殖した細胞によるミクロスフェアの被覆率（4日間の腹腔内移植後）

PEGゲル組成物	%細胞被覆率
18.5k	<1
18.5k90%:0.4k10%	<1
18.5k50%:0.4k50%	<1
35k90%:0.4k10%	5-7
35k50%:0.4k50%	<1

アルギン酸塩-ポリ(L-リジン) 60-80

細胞数の増加は、化学因子（例えば、インターロイキン）を分泌し、そして非定住マクロファージを移植部位に移動させる定住マクロファージ（resident macrophages）が活性化した結果である。この因子はまたコラーゲン合成に関与する線維芽細胞を引きつける。コーティングされる化学組成物による細胞数の変化を図8（A-F）に示す。図より、すべてのPEGコーティングされた球が実質的に細胞数を減少させたことが理解され得る。このことは、PEGコーティングが一般に腹腔に刺激を与えないことと一致する。

しかしながら、PEG組成物には生体適合性における差異があり、そして分子量を増加させることは細胞数の減少と関連している。これは、高分子量オリゴマーからつくるられるゲルが、より長い鎖長に起因する潜在的に大きな立体反発を有するためであり得る。

#### 実施例11:PEGゲルの透過性

ウシ血清アルブミン20mg、ヒトIgG、またはヒトフィブリノーゲンを、PBS中のオリゴマーPEG18.5kテトラアクリレート溶液（23%w/v）2mlに溶解させた。この溶液をレーザーで重合させ、2cm×2cm×0.5cmの大きさのゲルを生成した。ウシ血清アルブミン、ヒトIgG、およびヒトフィブリノーゲン（それぞれ、分子量66kDa、150kDa、350kDa）の拡散を、全タンパク質アッセイ試薬（Bioread）を用いて、これらのゲルの2cm×2cmの面を通じて検査した。PEG18.5kゲルの典型的な放出のプロフィールを図9に示した。このゲルはアルブミンをゆっくり輸送したが、IgGおよびフィブリノーゲンは拡散させなかつた。このことは、これらのゲルが免疫保護バリアとして用いられ得ることを示している。これは、動物組織の適切なマイクロカプセル化材料として重要な要求を満たす。

放出のプロフィールは、架橋密度およびポリエチレングリコール部分のモノマーの分子量の関数であることが見い出された。図10は、PEOジアクリレートおよびテトラアクリレート（それぞれ0.4kおよび18.5k）の23%溶液から作られたゲルからのウシ血清アルブミン（BSA）

の放出を示す。18.5kのゲルはアルブミンを自由に透過させ、対して0.4kのゲルはアルブミンの拡散を制限したことが明らかである。これらのゲルからのいかなる物質の放出も、網目構造の架橋密度に依存し、そしてまた網目構造のPEG部分の運動性に依存する。この効果はまたマクロマーの機能性に依存していた。例えば、PEG18.5Kテトラアクリレートゲルの透過性は、他の点は同一であるPEG20Kジアクリレートゲルの透過性より低かった。

#### 実施例12:生体適合性を増大するPEGゲル層を形成するためのシリコーンゴム処理

2×2cmの医療用シリコーンゴムを、0.4k PEGジアクリレート（23%）および2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン（0.5%）を含むベンゼン中に1時間浸漬した。この膨張したゴムを長波長UVランプ（365nm）で15分間照射した。照射後、試料をベンゼンで洗浄し、そして乾燥した。空気中でのシリコーンゴムと水との接触角を、処理前および処理後に測定した。未処理シリコーンゴムの最初の接触角が63°であるのに対して、処理後は接触角が50°に減少した。このことは、ゴム表面にPEGゲルが存在することにより親水性が増加することを反映する。

この方法は、マクロマー重合を、ポリマー表面を改質して生体適合性を増大するために用い得ることを示唆する。例えば、PEGでコーティングした移植可能なデバイスを得るために、ポリウレタンカテーテルをこの方法で処理し得る。PEGはポリウレタンカテーテルの表面に堅く結ばれた。なぜなら、光重合する前の浸漬段階で、マクロマーがカテーテル表面に浸透した（1～2ミクロンの深さまで）からである。これが照射されると、中まで入り込んだPEGとポリウレタンの網目構造が生じる。こうして、PEGはポリウレタンと非常に強く結ばれた。

#### 実施例13:重合速度

レーザー開始重合による多官能性アクリルモノマーのゲル化の速さを明確にするため、典型的な反応の速度を測定した。トリメチロールプロピルトリアクリレート（マクロマー混合物1mlあたりN-ビニルピロリドン10μモル中に、光開始剤としてエチルエオシン5×10<sup>-4</sup>M、および助触媒としてトリエタノールアミン0.1Mを含有する）を、500mWのアルゴンイオンレーザーで照射した（波長514nm、出力3.05×10<sup>5</sup>W/m<sup>2</sup>、光線幅1mm、生成したゲルの平均の直径1mm）。レーザー照射時間に対する、レーザー光線の貫通により形成されるゲルのスパイク長のプロットを図11Aに示す。マクロマーへのレーザー光貫通の結果として形成されるスパイクが、図11Bで理解され得る。

開始剤溶液（N-ビニルピロリドン中に2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノン300mg/ml）3μlを含有するHEPES緩衝生理食塩水中の種々のマクロマー溶液（23%w/w）100μlをカバーガラス上に置き、そして低強度長波長UV（LWUV）ランプ（Black-Ray、フラッ

ドライトのモデル3-100A)を照射した。ゲル化が生じるのに要求される時間を測定し、そして表4に示す。この時間は、典型的には、10秒の範囲内である。

表4: 照射ポリマーのゲル化時間

ポリマーの大きさ	ゲル時間(秒)
(平均±S.D.)	
0.4K	6.9±0.5
1K	21.3±2.4
6K	14.2±0.5
10K	8.3±0.2
18.5K	6.9±0.1
20K	9.0±0.4

300 μmの直径(マイクロカプセル化技術に用いられるゲルの典型的な大きさ)の小滴をゲル化するには、約10~100msの時間で十分である。このような迅速なゲル化により、マクロマーが適切に選択されるならば、三次元的に共有結合したポリマー網目構造中に生存細胞を包括し得る。適切な発色团が存在しなければ、単色レーザー光は細胞に吸収されない。そして、波長が約400nmよりも長いと、細胞には無害であると考えられる。長波長紫外光(360nmより大きい)の照射は、実用上の強度および時間においては無害である。

マクロマーの重合速度は、マクロマーの濃度、開始剤の濃度、およびマクロマーの官能性(例えば、PEGジアクリレートの二官能性、またはPEGテトラアクリレートの四官能性)、ならびに材料のアクリル化の度合に依存

する。

#### 実施例14:PEGゲル相互作用

HFF(ヒト皮線維芽細胞)細胞との生体適合性を以下のように説明した。HFF細胞を、10%ウシ胎児血清を含むDulbecco変換Eagle培地中の18,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、PEG18.5Kテトラアクリレートゲル上に植え付けた。次いでゲルを、5%CO<sub>2</sub>環境下37°Cで4時間インキュベートした。この終了時点で、ゲルをPBSで洗浄してすべての非付着細胞を除去し、位相差顕微鏡で拡大率200×で観察した。

図12Aは、ガラス表面(図12B)と比較した、これらの細胞の典型的なPEGゲル上での増殖を示す。1cm<sup>2</sup>当たりの付着細胞の数は、対照のガラス表面では13,200±3,910であるのに対し、ゲル表面では510±170であることが分かった。これらのゲル上の細胞は円形であり、通常のスプレッド形態ではなかった。このことにより、これらのゲルは細胞の付着を助長しないことが強く示唆される。

ミクロスフェア上の生体適合性は、以下のように説明された。図13は、実施例10でマウスから体外移植したミクロスフェアの写真を示す;4日後に非常にわずかな線維性過増殖がみられる。タンパク質吸着およびそれに伴う細胞増殖に対するPEG鎖の抵抗性は、かなり立証されている。表5は、4日間腹腔内に移植した後に、種々のPEGジアクリレートゲルから形成されたこれらのミクロスフェア上でみられる細胞の過増殖の程度をまとめたものである。

表15: ゲル上の細胞過増殖の程度

ゲル用のPEGジアクリレート (分子量、ダルトン)	細胞過増殖の割合
400	5 - 10%
1,000	15 - 25%
5,000	3 - 5%
6,000	2 - 15%
10,000	10 - 20%
18,500	4 - 10%

#### 実施例15:PEGゲルの特徴付けおよび力学的分析

ビニル-2-ピロリドン中に30mg/mlの2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを含有する10μlの開始剤溶液を、PEGジアクリレート(0.4K、6K、10K)およびPEGテトラアクリレート(18.5K)の23%w/v溶液1mlにつき加えた。マクロマーを含有する開始剤溶液を4.0×1.0×0.5cmの型にいれ、長波長紫外線ランプ(365nm)に約10秒間あて、ゲル化を誘導した。試料は、分析を行う前に1週間リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)中で平衡化させた。

一連の「ドッグボーン(dogbone)」試料(スラブを犬の骨の形状に切り取った試料、両端が広く中央ほど狭く長い形状である)を最大引っ張り強さ試験用に切断し

た。試料の厚さは、それらが切り取られた試料の厚さにより定義した。これらの厚さは約0.5mm~1.75mmの範囲であった。狭い「ネック」領域では、試料は長さ20mmであり幅2mmであった。応力-歪み試験では、1秒当たり4%の速度で長さをコントロールして行った。各試験後、横断面の面積を測定した。表6は最大引っ張り強さのデータを示す。低分子量のマクロマーは、一般に、高分子量のマクロマーを用いて生成されるゲルよりも伸長性の低い、強いゲルを生成することが分かる。PEG18.5Kテトラアクリレートゲルは、このシリーズにおいて例外的であり、これはマクロマーの多官能性および生成するゲルのそれに対応する高い架橋密度に起因している。この種の強度評価の結果は、4つのフリーラジカル感応性基

(例えばアクリレート基)以外を有して得られるマクロマーについても同様に得られる。

表6：ゲル強度試験

	0.4K	PEG 6K	アクリレート前駆体分子量 10K	18.5K
応力 (kPa)	★ 1.68+-5	9.8+-1.5	3.3+-7	1.15+-5.6
%歪η <sub>s</sub>	★ 8+-3	7.1+-1.3	1.10+-9	4.0+-1.5
傾斜 値は平均値+-S, D, である	★ 2.2+-5.1	3.2+-0.1	2.27+-0.04	2.67+-0.55

クリープ試験については、8つの試料(約0.2×0.4×

2cm)を生理食塩水中に浸漬しながら負荷した。それらは、1時間の間、一定の所定荷重をかけ、そして10分間負荷をゆるめて回復させることにより試験した。本研究には、1K、6K、および10KのPEGジアクリレート、ならびに18.5KPEG分子量のPEGテトラアクリレートから生成されたゲルを用いた。10Kの試験は、測定限界を超えたために中止した(試料は負荷フレームの可動域を越えて伸長した)。1K試料は、10gの負荷をかけ、その後負荷を0.2gに弱めて試験した。6K試料は、13gの負荷をかけ、その後負荷を0.5gに弱めて試験した。18.5K試料は、13gの負荷をかけ、その後負荷を0.2gに弱めて試験した。これらの試料に対する負荷を選択することにより、一次および二次領域を有する一般的なクリープ曲線が得られた。1K、6K、および18.5Kの試料のクリープ軌跡は、それぞれ図14AからCに示される。

#### 実施例16:PEGゲルの含水量

種々のマクロマー溶液を上記のようにして生成した。ディスク形のゲルを型を用いて生成した。各ディスクに対し、400μlの溶液を用いた。完全なゲル化を確実にするために、この溶液を2分間照射した。ディスク形ゲルを取り出し、真空下60°Cで2日間乾燥した。ディスクを計量し(W1)、次いで1日間クロロホルムで繰り返し抽出した。ディスクを再び乾燥し、そして計量した(W2)。ゲル画分をW2/W1として計算した。このデータを表7に示す。

抽出に続き、過剰の水を注意深く拭き取った後、ディスクをHBSで6時間平衡化させ、そして計量した(W3)。全含水量を(W3-W2)×100/W3として計算した。ゲル含水量のデータを以下の表にまとめて示す。

表7: ゲル含水量データ

ポリマーコード	総水量(%)	ゲル含量(%)
0.4	—	99.8±1.9
1K	79.8±2.1	94.5±2.0
6K	95.2±2.5	69.4±0.6
10K	91.4±1.6	96.9±1.5
18.5K	91.4±0.9	80.3±0.9
20K	94.4±0.6	85.0±0.4

#### 実施例17:移植後のPEGゲルの力学的安定性

PEGジアクリレート(10K)およびPEGテトラアクリレート(分子量、18.5K)を、犬の骨の形状に実施例15に記載のようにmM HEPES、pH7.4)(開始剤として900ppmの2,2-ジメトキシ-2-フェノキシアセトフェノンを含有する)中の23重量%のPEGジアクリレートまたはテトラアクリレートをアルミニウムの型に流し込み、LWUVランプ(Black線)で1分間照射した。これらの試料の開始重量は、これらのゲルを一定の重量になるまでオーブン乾燥して得られた。試料を、試験前に、ゲルマトリックスから未反応のプレポリマーをすべて浸出させる(ゾル浸出)ために、ソックスレー抽出法により36時間塩化メチレンで抽出した。抽出過程は、乾燥したゲルが

一定の重量になるまで続けた。

ICR Swiss雄白マウス（6～8週齢）（Sprague-Dawley）を、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射により麻酔した。マウスの腹部を剃り、ベタジン（betadine）で調製した。腹部中央線の長さ10～15mmの切開を行った。滅菌PBS（リン酸緩衝生理食塩水）またはHEPES緩衝生理食塩水中で十分に水和させた（カルシウム沈着研究のため）ポリマー試料を、切開部に挿入し、創傷部位からはなれた腸間膜上においてた。腹膜壁を、かぎステッチランニング縫合（lock stitched running suture）

（4.0絹、Ethicon）で閉じた。皮膚をステンレス鋼皮膚ステープルで閉じ、局所抗生物質（Furacin）を切開部位に付与した。3匹の動物を各時点に対し用いた。1つのドッグボーン試料をマウス1匹につき移植し、1週間、3週間、6週間、および8週間の終わりに体外移植した。体外移植ゲルをHBS中で2回すすぎ、次いで0.3mg/mlプロナーゼ（Calbiochem）で処理し、付着細胞および組織を除去した。次いで、前述したように、試料を、一定の重量になるまでオーブン乾燥し、そして抽出し、再膨張させた（reswelled）。

引っ張り応力-歪み試験を、小型の水平動インストロン様装置で、コントロール（移植せず）と体外移植した

ドッグボーンとの両方で行った。この装置は、2つの平行なアルミニウムガイド間の木製板に、水平にマウントした2つのクランプ（clamp）からなるアルミニウムプラットフォームである。トップクランプは固定しており、ボトムクランプは可動性である。可動クランプの摩擦表面とプラットフォームの両方ともがアルミニウムバックテフロン（aliminium backed Tefron）（Cole-Parmar）でコートされており、摩擦抵抗性を最小限に抑えている。可動クランプは、負荷を徐々に増加して与え得る装置に固定されている。装置全体を解剖顕微鏡（Reichert）の下に水平におき、試料の伸びをビデオカメラを用いてモニターする。カメラからの画像は、画像プロセッサー（Argus-10, Hamamatsu）により得られ、モニターに送られる。破断後、破断面の横断面を切断し、その面積を測定した。破断時の負荷をこの断面積で割って、最大引っ張り応力を得た。表8は、種々の時間間隔で体外移植したPEGテトラアクリレート（18.5K）ヒドロゲルの破碎（fracture）での応力を列挙する。引っ張り強度での時間的な変化は顕著ではないことが明らかである。従って、このゲルは、マウスの移植の最大時間枠内で、インビボでの生体分解に対し力学的に安定である。

表8：ポリマー移植の分解に対する抵抗性

移植時間	応力（kpa） (平均値±誤差★)	歪み平均 (平均値±誤差★)
1週	52.8±16.7	0.32±0.19
3週	36.7±10.6	0.37±0.17
6週	73.3±34.9	0.42±0.26
8週	34.1#	0.30#
コントロール	44.9±5.3	0.22±0.22
★	90%信頼限界に基づく誤差	
#	1つの試料	

#### 実施例18:PEGゲルのカルシウム沈着のモニタリング

ディスク形PEGテトラアクリレートヒドロゲル（分子量18.5K）を、上記のようにしてマウスの腹腔内に、1週間、3週間、6週間、または8週間にわたって移植した。体外移植ゲルをHBS中で2回すすぎ、そしてプロナーゼ（Calbiochem）で処理し、細胞および細胞デブリを除去した。次いで、試料をHBS中で平衡化させ、遊離Ca<sup>++</sup>をゲルマトリックスから拡散させた。次いで、ゲルを一定の重量にまでオーブン乾燥し（Blue-M）、酸化アルミニウムのるつぼ（crucible）（COORS、耐高温性）に移した。それらを炉中で少なくとも16時間、700°Cで

焼成した。るつぼを全体の焼成に対してチェックした。いかなる残留物またはデブリも認められるならば、それをさらに12時間焼成した。続いて、るつぼを2mlの0.5M HClで満たし、試料中のCa<sup>++</sup>塩および他の無機物を溶解させた。この溶液を濾過し、カルシウム含量を原子吸光分光法（AA）で分析した。

PEGテトラアクリレート（分子量18.5K）ゲル移植片のカルシウム沈着データを表9に示す。マウスの8週間移植まで、カルシウム沈着の顕著な増加はみられなかつた。

表9：PEGテトラアクリレート（分子量18,5K）ゲル  
移植片のカルシウム沈着データ

時間 (日)	カルシウム沈着 (平均値±誤差★) (mgカルシウム/g乾燥ゲル重量)
7	2.33±0.20
21	0.88±0.009
42	1.08±0.30
56	1.17±0.26

★ 90%信頼限界に基づく誤差

実施例19：切断神経を再結合する接着剤としてのPEGゲルの使用

PEGテトラアクリレート(10%、18.5K)の製剤を、ラットの離断した坐骨神経末端の縫合によらない付着を安定させるための接着剤として用いた。ラットをペントバルビタール麻酔下で、外科的滅菌処置を施した。坐骨神経を、中央大腿部レベルで大腿二頭筋の頭部をそらすことにより、側部からさらした。坐骨神経を約1cm動かし、虹彩切除はさみで頸骨一腓骨分岐の近位約3mmを開いた。切断された神経の末端間の隔たりは2~3mmであった。創傷を生理食塩水で洗浄し、軽く拭いて過剰の生理食塩水を取り除いた。滅菌した未重合のPEGテトラアクリレート溶液を創傷部に付与した。外膜または神経周膜を保持するために精緻な鉗子を用いて、神経末端を付着させ、光開始剤として2,2-ジメトキシ-2-フェノキシアセトフェノンを含有するマクロマー溶液を神経末端に付与し、創傷を長波長UV光(365nm)に約10秒間あて、接着剤を重合した。鉗子を穏やかに引き出した。マクロマー溶液が2つの神経断端間を流れないように注意を払った。あるいは、神経断端接合部を照明から保護し(例えば金属箔で)マクロマー溶液の断端間でのゲル化を防いだ;次いで、残っているマクロマー溶液を洗い流した。

別のアプローチでは、離断神経の両末端が1対の鉗子を用いて一緒に保持され得る。鉗子の先端をワセリンで軽くコートし、接着剤との反応を防ぐ。

重合した接着剤は、創傷をカプセル化し、神経を基礎となる筋に接着する働きをする。神経末端の吻合は、接合部の緩慢な移動を阻止し、適度の安定性を示す。筋および皮膚を縫合糸で閉じた。1ヶ月後の再検査では、切断神経は、動物の活動が拘束されないにも関わらず、再結合した状態が保たれていることが示される。

実施例20：外科手術用接着剤

雌ニュージーランド白ウサギ由来の腹筋皮弁を切り取り、1cm×5cmの小片に切断した。この皮弁は約0.5~0.8cmの厚さであった。このような皮弁を2つ用いて、重なり接合部を1cm×1cmにした。2つの異なるPEOジーおよびテトラーアクリレートマクロマー組成物(0.4K(ジー)および18.5K(テトラー))を評価した。0.4K組成物は粘性流体であり、さらに希釈することなく用いた。

18.5K組成物はHBS中の23重量%溶液として用いた。50μlのトリエタノールアミンと共に、n-ビニルピロリドン(20mg/ml)中の125μlのエチルエオシン溶液を、各接着剤溶液の1mlに加えた。100μlの接着剤溶液を重なった皮弁の各々に付与した。次いで、重なり接合部を、2Wアルゴンイオンレーザーで30秒間、各側面から走査して照射した。得られた接合部の強度を、重なり接合部を剪断するのに必要とされる力を測定することにより評価した。重なり接合部の一端をクランプ固定し、他端に負荷を増加させながら与えた。この負荷は、接合片を水平に保ち破断するまでかけた。4つの接合片を各組成物に対して試験した。0.4K接合部は、12.0±6.9KPa(平均値±S.D.)の強度を有し、一方18.5K接合部は2.7±0.5KPaの強度を有していた。光重合を達成し、そして組織の厚さが6~8mmであるにも関わらず適度な接合強度を得ることができたことは、かなり注目すべきことである。514nmの光を用いる分光光度計による評価は、このような筋組織に対して1%未満の透過であったことを示した。

実施例21：ポリビニルアルコールの改変

2gのポリビニルアルコール(分子量100,000~110,000)を20mlの熱DMSOに溶解した。この溶液を室温まで冷却し、アルゴン雰囲気下で、0.2mlのトリエチルアミンおよび0.2mlのアクリロイルクロライドを激しく攪拌しながら加えた。反応混合物を2時間の間70°Cに加熱し、そして冷却した。ポリマーをアセトンで沈殿させ、熱水に再溶解し、そしてアセトンで再び沈殿させた。最終的に、それを真空下60°Cで12時間乾燥した。PBS中のこのポリマーの5~10%w/v溶液をUV光開始剤と混合し、長波長UV光を用いて重合し、200~1,000ミクロンのサイズのミクロスフェアを作製した。

これらのミクロスフェアは水中での加熱に対して安定であり、このことはゲルが共有結合により架橋していることを示唆する。このゲルは極度に弾性である。このマクロマー、すなわちPVA多官能性アクリレートは、PEGジアクリレートゲル中の架橋密度を増加させるのに用いられ得、これに対応して機械的特性および透過性を変化させる。このアプローチは、光重合可能な基で化学的に改変された多数の水溶性ポリマーについて行われ得る。このアプローチは、例えば、以下から選択される水溶性ポリマーについて行われ得る：ポリビニルピロリドン、ポ

リエチルオキサゾリン、ポリエチレンオキシドーポリブロピレンオキシドコポリマー、多糖（例えば、デキストラン、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、グアーガム、ゲランガム、キサンタンガム、ガラゲナンガム）、およびタンパク質（例えば、アルブミン、コラーゲン、およびゼラチン）。

#### 実施例22:他の光重合可能部分の使用

多くの光重合可能な基が、ゲル化を容易にするために用いられ得る。別の典型的な合成を説明するために、PEG1Kウレタンメタクリレートの合成を以下に記載する：

250mlの丸底フラスコ中で、10gのPEG1Kジオールを150mlのベンゼンに溶解した。3.38gの2-イソシアナトエチルメタクリレートおよび20μlのジブチルスズジラウレートを、フラスコ中にゆっくりと入れた。反応物を6時間還流し、冷却し、1000mlのヘキサン中に注いだ。次いで、沈澱物を濾過し、真空下60°Cで24時間乾燥した。この場合、メタクリレートフリーラジカル重合可能基は、例えばアリールオキシルクロライドと反応させたときに得られるようなエステル結合ではなく、ウレタン結合によりポリマーに結び付けられた。

#### 実施例23:光重合可能ポリカチオンによるアルギン酸塩-PLL-アルギン酸塩マイクロカプセルの形成

アルギン酸塩-ポリリジン-アルギン酸塩マイクロカプセルを、アルギン酸塩のゲムミクロスフェア上で、ポリカチオン（例えばポリリジン（PLL））を吸着またはコアセルベートすることにより作製する。得られた膜は、電荷-電荷相互作用により合わせて維持されるので、安定性が制限される。この安定性を増大させるために、ポリカチオンは、例えば炭素-炭素二重結合を導入することにより、光重合可能に生成され得る。これは、膜の安定性を膜自身により増大させるために、または、例えば光重合可能PEGと反応させて生体適合性を高めるために用いられ得る。

このような光重合可能ポリカチオンの合成を説明するために、1gのポリアリルアミン塩酸塩を100mlガラスピーカー中で秤量し、10mlの蒸留水（DW）に溶解した。0.2M水酸化ナトリウム溶液を用いて、ポリマー溶液のpHを7に調整した。次いで、ポリマーを大量のアセトン中に沈澱することにより分離した。次いで、これを10mlD W中に再溶解し、この溶液を50ml丸底フラスコに移した。0.2mlのグルシジルメタクリレートをゆっくりと反応フラスコ中に入れ、反応混合物を室温で48時間攪拌した。この溶液を200mlアセトン中に注ぎ、沈澱物を濾過により分離し、真空下で乾燥した。このマクロマーは、PEGジアクリレートのような第二の重合可能種の存在下または非存在下のいずれにおいても、アルギン酸塩-PLL-アルギン酸塩を光化学的に安定化させるのに有用である。

アルギン酸塩のような物質中に細胞をカプセル化する

ことに用いるのに加えて、このような光重合可能ポリカチオンは、PEG光重合可能ゲルに結合する光重合可能ポリマーの吸着によって、細胞、細胞凝集体、組織、および合成材料に対するポリマー接着を高めるためのプライマーまたはカップリング剤として有用であり得る。

#### 実施例24:合成赤血球用のヘモグロビンのカプセル化

遊離型のヘモグロビンは、PEGゲル中にカプセル化され、拡散を妨害するPEGの鎖長および架橋密度を選択することにより保持され得る。ゲルからのヘモグロビンの拡散は、ポリヘモグロビン（ヘモグロビンの架橋体である）の使用によりさらに妨害され得る。ポリヘモグロビン分子は大きすぎるため、PEGゲルから拡散できない。天然または架橋ヘモグロビンのいずれかに適切であるカプセル化が、合成赤血球の製造に用いられ得る。これらの高生体適合性物質からなる5ミクロン未満の小球中にヘモグロビンを包括することにより、架橋ヘモグロビンまたはリポソームでカプセル化したヘモグロビンに比較して循環時間が長くなる。

PBS中のヘモグロビンを、以下の処方のプレポリマーと共に混合する：

#### 所望とされる量のヘモグロビン

PEG DA (MW10000)	35%
PEG DA (MW1000)	5%
PBS	60%

上記溶液は1.6%の2.2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを有する。

この溶液を、鉛油5部に対しヘモグロビン/プレポリマー溶液1部の割合で鉛油中に入れ、モーター-ミキサーで激しく攪拌してエマルジョンを形成させる。次いで、これに長波長紫外光（360nm）を5分間照射し、PEGプレポリマーを架橋させてゲルを形成させる。プレポリマーの分子量は、ゲルからのヘモグロビンの拡散を阻止するように選択され得、PEG分子量が小さいほど拡散が少なくなる。PEG DA1000とさらに架橋した分子量10,000のPEG DAは、ヘモグロビンの拡散を制限するのに適切な透過選択性を有しており、そして血流内を循環するのに適切な生体適合性を有している。

#### 実施例25:代謝障害の矯正および化学療法のための酵素の包括

酵素カタラーゼの先天的欠損により、無カタラーゼ血症が起こる。PEGゲル網目構造中のカタラーゼの固定化は、この疾患を治療する酵素置換の方法を提供する。同様にグルコシダーゼの包括は、ゴシエ病を治療するのに有用であり得る。ウレアーゼを包括するミクロスフェアのPEGゲルは、尿素をアンモニアに変換するために体外血液中で用いられ得る。アスペラギナーゼのような酵素は、腫瘍細胞によって必要とされるアミノ酸を分解し得る。これらの酵素の免疫原性のために、化学療法における直接的な使用が妨害される。しかし、このような酵素をPEGゲルに包括することにより、化学療法を首尾よく

援護し得る。適切な製剤が、酵素の遅延放出または無放出のいずれかのために開発され得る。

PBS中のカタラーゼを、以下の処方のプレポリマーと共に混合する：

所望とされる量のカタラーゼ

PEG DA (MW10000)	35%
PEG DA (MW1000)	5%
PBS	60%

上記溶液は1.6%の2,2-ジメトキシ-2-フェニルアセトフェノンを有する。

この溶液を、鉛油5部に対しカタラーゼ/プレポリマー溶液1部の割合で鉛油中に入れ、モーター-ミキサーで激しく攪拌してエマルジョンを形成させる。このエマルジョンに長波長紫外光(360nm)を5分間照射し、PEGプレポリマーを架橋させてゲルを形成させる。プレポリマーの分子量は、ゲルからのカタラーゼの拡散を阻止するように選択され得、PEG DA分子量は小さいほど拡散が少なくなる。

PEG DA1000とさらに架橋した分子量10,000のPEG DAは、カタラーゼの拡散を制限するのに適切な透過選択性を有しており、そしてゲルに包括されたカタラーゼへ過酸化水素を拡散させるのに適切な透過選択性を有している。このため、過酸化水素は血流から酵素除去される。さらに、PEG DAは、血流内を循環するのに適切な生体適合性を有している。

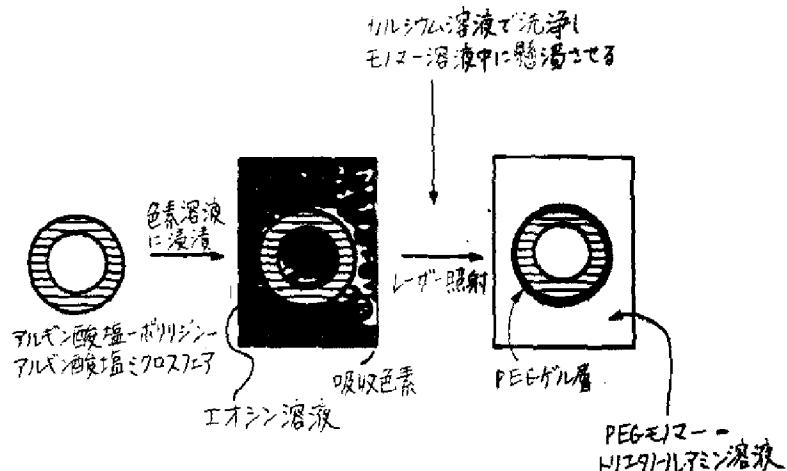
このように、ゲルは、体内で生物活性物質の制御的封じ込めに用いられる。活性物質(酵素)は大きく、ゲルの中に保持され、それが作用する物質(基質)は小さく、酵素に富む区画(enzyme rich compartment)中に拡散し得る。しかし、活性物質は、身体または標的とされる身体区画から排出されることを妨げられる。これは活性物質がゲル区画から拡散し得ないからである。

#### 実施例26: 抗ヒト免疫不全ウイルス薬のインビボでの評価のための細胞のマイクロカプセル化

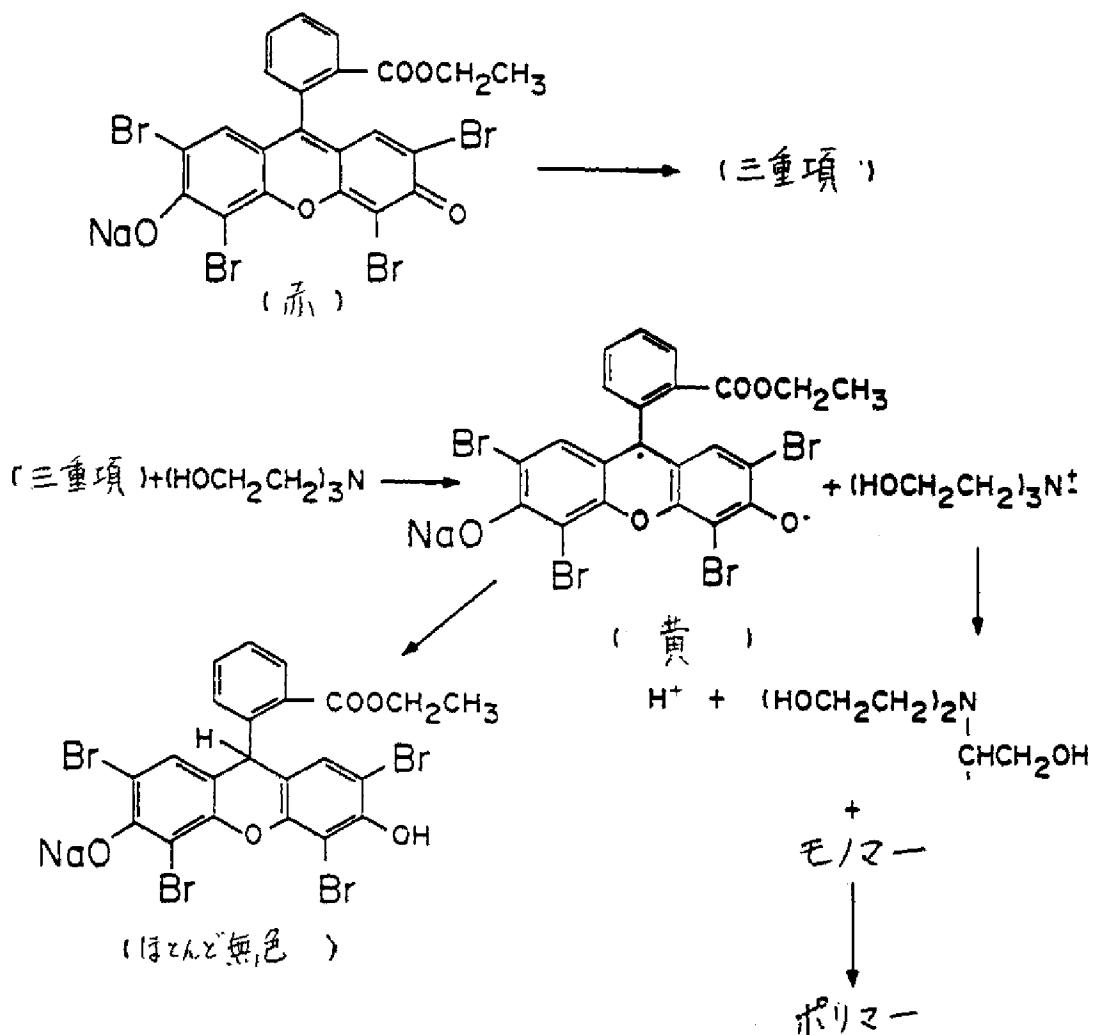
HIVに感染したまたは感染していないヒトのTリンパ芽球様細胞を、上記の他の細胞に関する記載のようにしてPEGゲル中にカプセル化し得る。これらのマイクロカプセルを、抗HIV薬のための試験系を提供する非ヒト動物に移植し得、次いで、試験薬物(例えばAZTまたはDDI)で処理し得る。処理後、マイクロカプセルを回収し得、カプセル化細胞を、フルオレセインジアセテート/エチジウムプロミド生存/死滅細胞アッセイを用いて、生育能力および機能正常性に対してスクリーニングする。感染細胞の生存は、薬剤の作用が成功したことを示唆する。薬剤評価に対するこのアプローチにおける報告されている問題点は生体適合性の欠如であるが、本明細書中に記載のゲルを用いることにより克服され得る。

改変および変形は、上述の詳細な説明から明らかである。このような改変および変形は、添付の請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

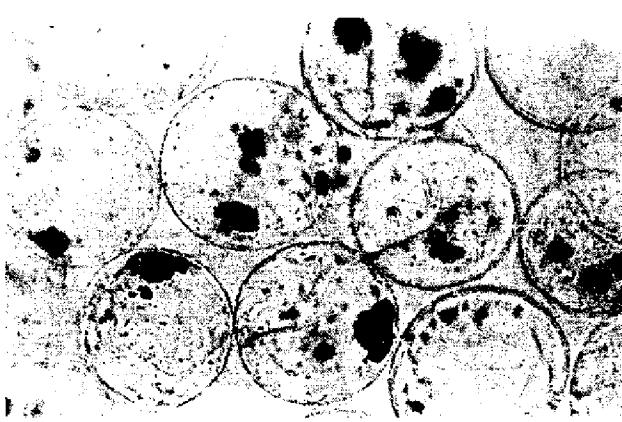
【第2a図】



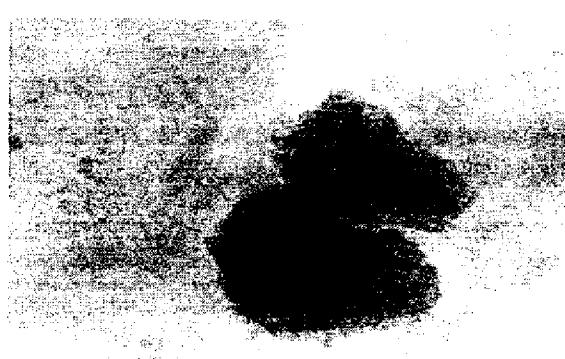
【第1図】



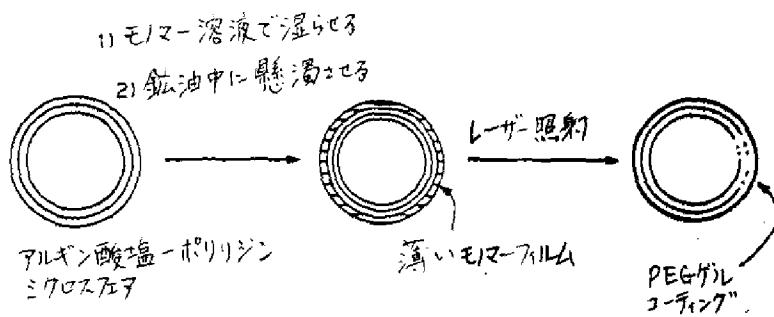
【第2B図】



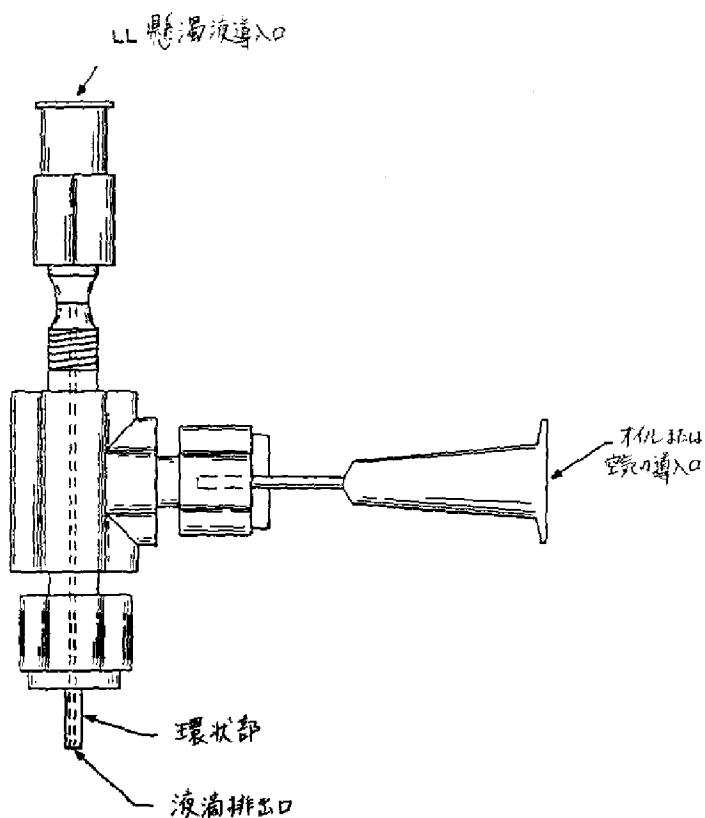
【第4図】



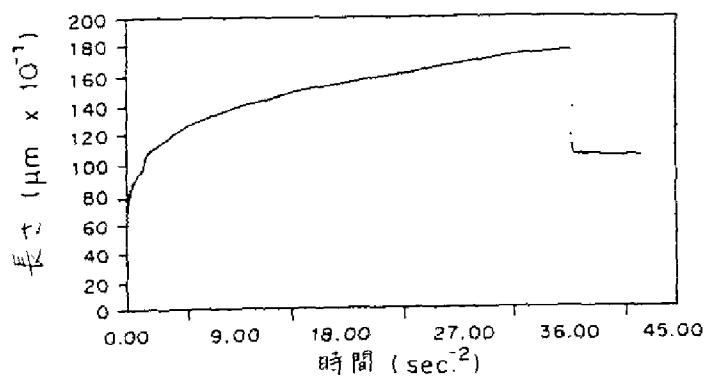
【第3図】



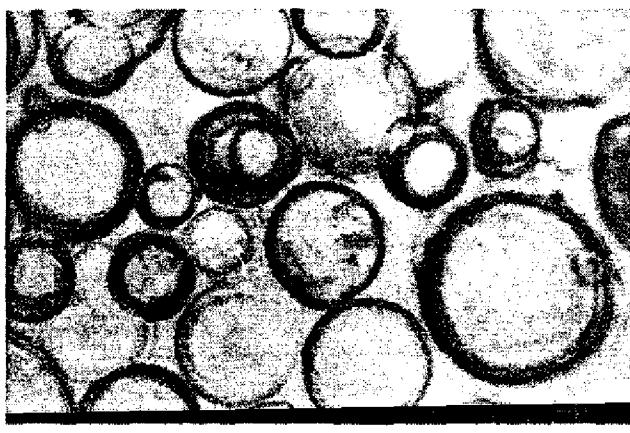
【第5図】



【第14a図】



【第6図】



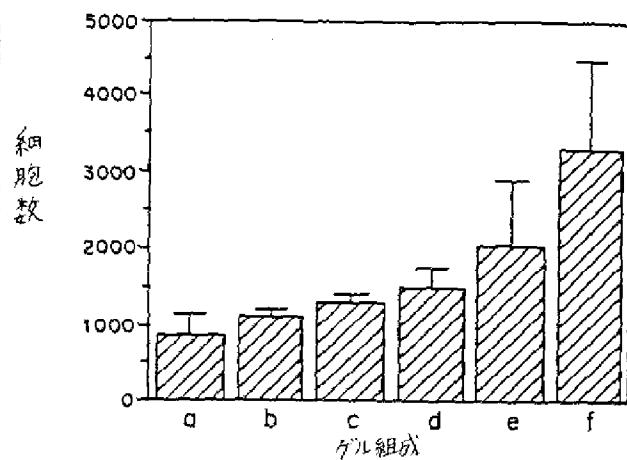
【第7A図】



【第7B図】

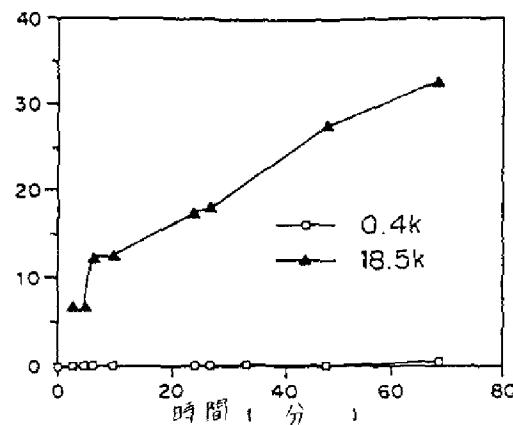
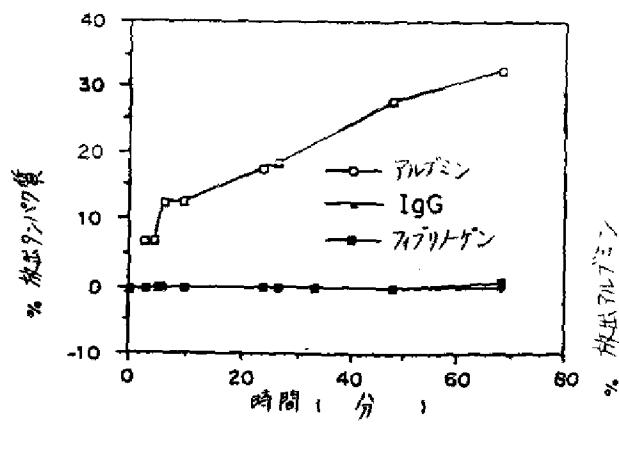


【第8図】

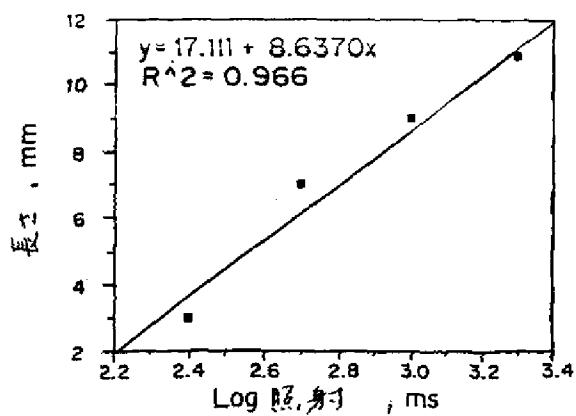


【第9図】

【第10図】



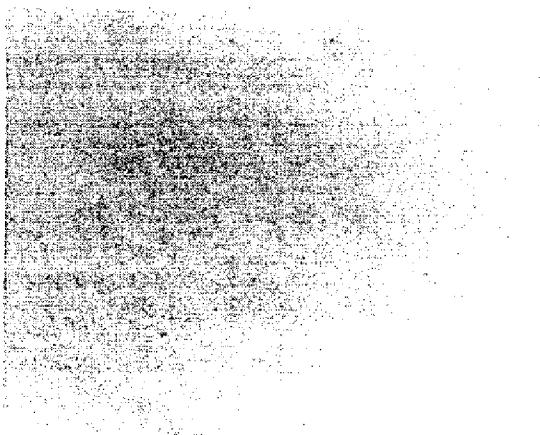
【第11a図】



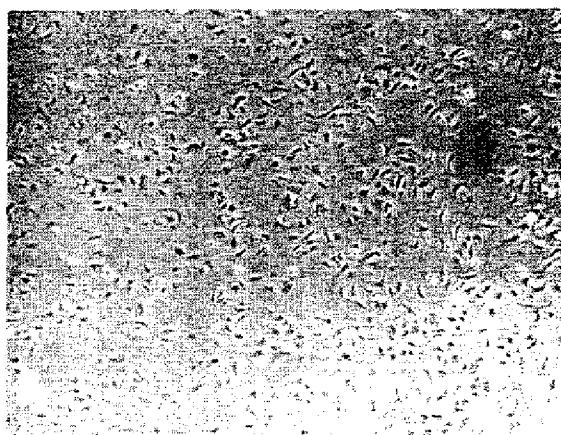
【第11B図】



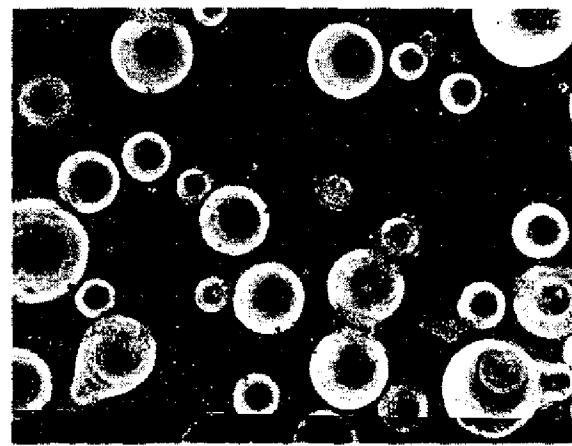
【第12A図】



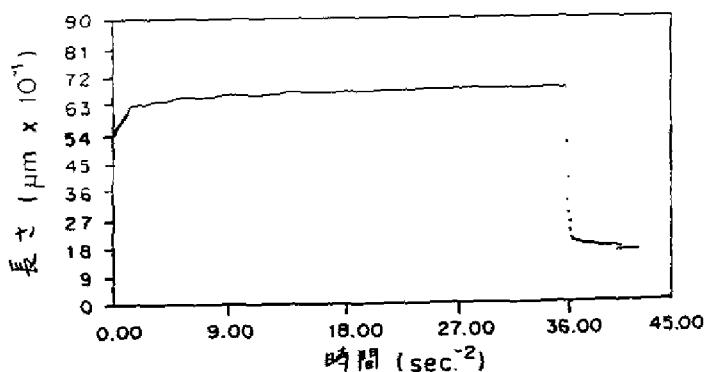
【第12B図】



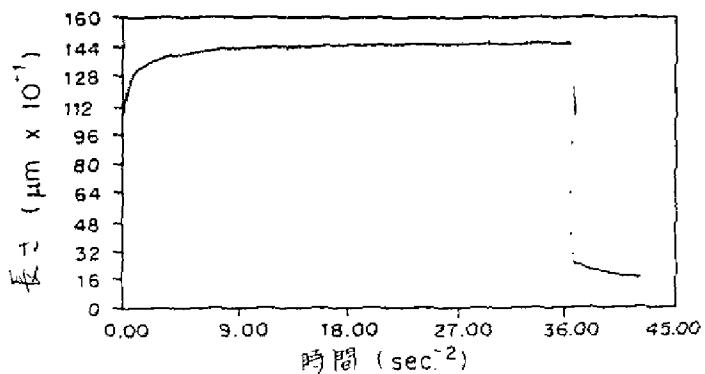
【第13図】



【第14b図】



【第14c図】



フロントページの続き

(31) 優先権主張番号 958, 870

(32) 優先日 平成4年10月7日(1992. 10. 7)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(72) 発明者 サーニー, アマルプリート エス.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ

02158, ニュートン, チャーチ ストリート 148

(72) 発明者 デサイ, ニール ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア

90036, ロサンゼルス, アランデール

アベニュー 847

(72) 発明者

ビル, ジェニファー エル.

アメリカ合衆国 テキサス 78741, オ

ースティン, ナンバー821, ウィッカーズハム レーン 2501

(72) 発明者 ホッシニー, シエド, エフ. エイ.

アメリカ合衆国 テキサス 78751, オ

ースティン, スピードウェイ ナンバー

105 3812

(56) 参考文献

米国特許4511478 (U.S., A)

米国特許4298002 (U.S., A)

米国特許5037656 (U.S., A)

米国特許4411754 (U.S., A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. 7, DB名)

A61K 9/50